

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

PUBLIÉES PAR

LA DIRECTION DE L'INSTITUT PASTEUR

Avec le concours des Chefs de Service
et des Chefs de Laboratoire

Secrétaire général : P. LÉPINE



MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS
Libraires de l'Académie de Médecine
120, Boulevard Saint-Germain
PARIS

SOMMAIRE DU N° 4

Sur un cas de télétoxie récemment mis à jour, par GABRIEL BERTRAND.	Page
Agglutinations croisées tularémie-brucelloses. Mise au point de la question, par G. GIRARD (avec la collaboration technique de A. CHEVALIER et L. SEGOND).	
Association de l'antigène méthylque et de la streptomycine dans le traitement de la tuberculose expérimentale de la souris, par C. LEVADITI, A. VAISMAN et H. CHAIGNEAU.	
Agglutination des leptospires, en particulier de <i>L. pomona</i> , par les sérums de porcs, par B. KOLOCHINE-ERBER et M. COLLOMBIER.	
A propos de l'emploi de la cellulose précipitée pour l'étude des bactéries cellulolytiques, par J. POCHON, Y. T. TCHAN, T. L. WANG et J. AUGIER.	
Immunsérums antihémolytiques, par R. LAPORTE, L. HARDRE DE LOOZE et P. ROULIER	
La technique de culture continue. Théorie et applications, par JACQUES MONOD	
Étude cytologique d' <i>Endosporus azotophagus</i> , par T. L. WANG et Y. T. TCHAN	
Nouvelles recherches sur le tactisme leucocytaire. Tactisme et oxydations cellulaires, par JACQUELINE LEBRUN PAGES et ROGER ROBINEAUX.	
Le contrôle bactériologique des produits biologiques au moyen d'un milieu permettant la culture à l'air libre des germes aérobies et anaérobies, par P.-H. BONNEL (avec la collaboration de MM. R. ARDREY, R. CHARY, F. HÉNAFF, B. MAUPIN, H. PERROT et M.-P. ROBERT)	
Préparation de lysats bactériophagiques de titre élevé. Purification et concentration des phages par deux adsorptions successives sur phosphate de calcium, par R. WAHL, A. TERRADE et G. MONCEAUX.	
Antibiotiques et lyse bactériophagique. — VII. L'action antiphage de la chloromycétine, par E. EDLINGER et M. FAGUET.	
Étude sur la gélification des protéines. — II. Action des alcools sur la gélification de la caséine, par COLETTE MAGIS.	
Sur la présence du bactériophage <i>perfringens</i> dans les eaux et son rôle dans l'épuration des eaux stagnantes, par A. GUELIN.	
Société française de Microbiologie (Sommaire page 4 de la couverture).	

Œuvres de Pasteur réunies par PASTEUR VALLERY-RADOT, tome V « Mélanges scientifiques et littéraires. Index analytique de l'œuvre Pasteur ». Un vol. gr. in-8° de 666 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939.

Albert Calmette. Sa vie. Son œuvre scientifique, par P.-Noël BERNAL et LÉOPOLD NEGRE. *Préface de Pasteur Vallery-Radot. Avant-propos A. Yersin*. Un vol. de 274 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939.

J. BORDET. — Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses Deuxième édit. Un volume de 880 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939.

ANDRÉ-R. PREVOT. — Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies. Un volume in-8° de 290 pages, 2^e édition (*Monographie de l'Institut Pasteur*). Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1948.

N. B. — Le paiement est accepté en toutes monnaies étrangères au cours du dollar au moment du règlement.

PRIX DE L'ABONNEMENT POUR 1950

France et Union Française	Fr. 2.000
(Règlement par mandat, chèques postaux [Compte n° 599 Paris] ou chèque bancaire.)	
Belgique et Luxembourg	Fr. B. 375
Autres pays	\$ U. S. A. 7

Prix également payables dans les autres monnaies au cours des règlements commerciaux le jour du paiement.

(Règlement par Banque Nationale.)

Changement d'adresse : 20 fr.

Secrétariat, 25, rue du Docteur-Roux, Paris (XV^e).

Publication mensuelle.

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

SUR UN CAS DE TÉLÉTOXIE RÉCEMMENT MIS A JOUR

par GABRIEL BERTRAND.

Dans un important et très intéressant mémoire, publié en 1934, sur les associations végétales [1], R. Monilier a fait connaître qu'en Provence occidentale, là où se développent soit le Romarin officinal, soit la Bruyère multiflore, la première de ces plantes en association avec quelques autres dont *Lithospermum fruticosum*, et la seconde surtout avec *Helianthemum lavandulæfolium*, on ne rencontre pas ou pour ainsi dire pas de plantes annuelles, celles-ci étant néanmoins répandues dans le voisinage.

A quelle cause peut-on attribuer ce phénomène ? R. Monilier a cherché cette cause dans la nature du sol, dans le manque de lumière, de place ou de porte-graines, dans l'altitude ou la pente du terrain ; il n'a pas réussi à la reconnaître. Il lui a paru qu'en dernière analyse il ne restait à la trouver que dans l'étude des propriétés biologiques ou microbiologiques du sol : « Il est possible, écrivit-il, que certaines espèces l'empoisonnent littéralement par des sécrétions radiculaires ; il est possible aussi que les micro-organismes et les Cryptogames jouent dans le sol un rôle beaucoup plus important que celui qu'on leur connaît déjà. »

Il restait une autre hypothèse : celle de l'accaparement par les espèces dominantes de certains éléments rares du sol, qui ne sont plus alors en proportions suffisantes pour nourrir les espèces annuelles.

G. Deleuil s'est intéressé récemment à ce curieux phénomène. Il a été conduit à envisager son explication par la présence dans le sol d'une substance toxique et vient de publier une série d'expériences probantes de cette présence. Il a même découvert

que les espèces caractéristiques des associations du Romarin et de la Bruyère mentionnées ci-dessus produisent une substance soluble dans l'eau qui, se répandant dans le sol où elles ont pris pied, le rendent nocif aux plantes annuelles [2].

On se trouve donc ici devant un cas nouveau et très typique de défense du milieu nutritif par *télétoxie* [3]. Ce cas n'a pas la simplicité de celui où par émission de bufotaline, le Crapaud interdit à la Grenouille le milieu où il s'accouple et pond ses œufs, c'est-à-dire du cas où une espèce déterminée triomphe d'une autre espèce également déterminée. Il est beaucoup plus complexe, car il s'agit cette fois d'un conflit entre deux groupes d'espèces formés l'un et l'autre de plantes phanérogames et qui, plus est, sont fort différentes au point de vue de la systématique : le premier groupe comprend des plantes vivaces, produisant soit une même substance toxique, soit des substances d'une toxicité très voisine, le second, des plantes offrant le caractère commun d'être annuelles et d'une grande sensibilité au poison des précédentes.

Il devient de plus en plus probable que la télétoxie intervient dans un grand nombre de phénomènes naturels.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. MOLINIER. *Ann. du Musée d'Histoire Naturelle de Marseille*, 1934, 27, 274 pages et 4 planches.
- [2] G. DELEUIL. *C. R. Acad. Sci.*, 1950, 230, 1362.
- [3] Ces *Annales*, 1946, 72, 810.

AGGLUTINATIONS CROISÉES TULARÉMIE-BRUCELLOSES. MISE AU POINT DE LA QUESTION

par G. GIRARD

[avec la collaboration technique de A. CHEVALIER et L. SEGOND] (*).

(Institut Pasteur. Service de la Peste.)

L'existence d'agglutinines communes à la tularémie et aux brucelloses a été pour la première fois signalée par Ed. Francis et Al. Evans en 1926 [1] qui notèrent que, sur 100 sérums tularémiques, 37 avaient des agglutinines brucelliques à des taux de 1/20 à 1/1.280. Dans 3 cas seulement, le titre était aussi élevé pour *Br. melitensis* et *Br. abortus* que pour *Past. tularensis*. L'épreuve de la saturation attestait la non-spécificité des anticorps brucelliques.

En outre, des sérums de malades atteints de fièvre ondulante pouvaient, d'après Francis et Evans, agglutiner l'agent de la tularémie. Sur 8 de ces sérums, 3 dont les taux d'agglutination pour *Br. melitensis* et *Br. abortus* étaient respectivement 1/2.500, 1/1.280, 1/640 agglutinaient *P. tularensis* aux taux de 1/80, 1/20, 1/10. Ces agglutinines tularémiques étaient absorbées par les antigènes brucelliques.

Depuis cette publication, des faits analogues ont été rapportés, mais leur interprétation n'est pas sans soulever de sérieuses critiques. Ainsi, S. Golem [2], en Turquie, trouve des agglutinines tularémiques à des taux de 1/10 à 1/320 dans des sérums pris au hasard chez l'homme et chez divers animaux ; dans un secteur donné, où tous les sérums humains sont négatifs, 57 p. 100 des sérums de chevaux agglutinent *P. tularensis* ; dans un autre secteur, on observe le contraire. Ailleurs, ces anticorps sont rencontrés chez des bovins, des buffles, des moutons, des chèvres, dans des proportions variant de 7 à 30 p. 100.

Le même auteur mentionne la présence de coagglutinines brucelliques dans un certain nombre de sérums tularémiques humains et animaux. R. Tovar, de son côté [3], applique au dia-

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 juillet 1950.

gnostic extemporané de la tularémie le procédé préconisé par Castaneda pour le typhus et les brucelloses ; il conclut à sa spécificité si le taux d'agglutination est au moins de 1/100, réserve faite des coagglutinines brucelliques que l'hémodiagnostic révèle également.

De telles imprécisions imposaient une révision de la question. Nous nous y sommes attachés en soumettant au séro-diagnostic de Wright tous les sérums tularémiques humains et animaux, naturels ou expérimentaux, reçus ou préparés à notre laboratoire. Nous rapportons ici nos constatations avec les conclusions qu'elles comportent du point de vue pratique.

POUR ÊTRE PRISES EN CONSIDÉRATION DANS LA TULARÉMIE, LE TAUX MINIMUM DE 1/100 EST INDISPENSABLE POUR LES COAGGLUTININES BRUCELLIQUES.

Sous réserve de l'opinion de L. Carrère et H. Quatrefages, rappelée dans un récent article de ces auteurs — nous y reviendrons plus loin — à l'Institut Pasteur où les sérums sont envoyés le plus souvent sans être accompagnés de renseignements cliniques, on exige un taux d'agglutination de 1/100 avec un sérum chauffé trente minutes à 56°, pour donner une réponse positive. Une longue expérience a justifié cette conception avec les antigènes brucelliques utilisés dans le service de R. Legroux dans la pratique du séro-diagnostic de Wright. L. Nègre et M. Raynaud ont en effet, dès 1910, signalé la présence dans des sérums normaux ou pathologiques d'agglutinines brucelliques non spécifiques à des taux pouvant atteindre 1/100, mais disparaissant par inactivation du sérum à 56°, contrairement aux anticorps spécifiques. Dans un travail d'ensemble synthétisant leurs recherches [4], ils montraient combien d'erreurs avaient été commises par la méconnaissance de ces notions.

Les auteurs étrangers, dont nous rappelons les publications, ne font aucune allusion à cette source possible d'erreurs qu'ils semblent ignorer, et imputent à la tularémie des coagglutinines brucelliques sans tenir compte de leur titre, par exemple de 1/10 à 1/50 et au-dessus. Comme ils ne précisent pas davantage la nature de leurs antigènes brucelliques et qu'ils opèrent avec des sérums non chauffés, nous estimons qu'au-dessous du taux de 1/100, la mise en évidence d'agglutinines brucelliques dans le sérum d'un sujet atteint de tularémie n'implique pas nécessairement que l'agent de cette infection soit à l'origine de leur formation. Aussi n'avons-nous pas jugé utile de procéder à la recherche des coagglutinines au-dessous du taux de 1/100. Par contre, le titrage des agglutinines tularémiques dans un sérum brucellique doit être fait à partir de 1/10, car dans la tularémie, les taux les plus bas ont leur signification tout au début de la maladie.

RECHERCHES PERSONNELLES.

1° AGGLUTININES BRUCELLIQUES DANS LES SÉRUMS TULARÉMIQUES.

— a) *Sérums humains*. — Cent cinquante-quatre sérums ont été éprouvés. Tous appartenaient à des malades qui avaient contracté la tularémie en France, tularémie incontestée, affirmée au triple point de vue clinique, épidémiologique et sérologique. Pour simplifier les opérations, les réactions étaient effectuées sur les sérums non chauffés. L'inactivation à 56° était ainsi limitée aux sérums positifs soumis à une seconde épreuve. Deux sérums virent disparaître leurs agglutinines brucelliques à 1/100 après chauffage. Nous ne les prenons pas en considération. Restent 5 sérums chez lesquels nous retenons, à côté des anticorps homologues, l'existence d'anticorps brucelliques au taux de 1/100 ou plus. Pour les interpréter comme des coagglutinines, il fallait éliminer l'hypothèse d'une atteinte antérieure de brucellose et, surtout, procéder à l'épreuve de l'absorption par les antigènes appropriés. Nous n'avons été en mesure d'y satisfaire que pour 2 de ces sérums dont nous disposons du volume nécessaire. Nous ne nous attarderons pas sur la technique suivie, classique et bien connue. La saturation de ces 2 sérums par *P. tularensis* fit disparaître toute trace d'agglutinine brucellique en même temps que les agglutinines spécifiques. L'épreuve inverse maintint à leur taux intégral les agglutinines tularémiques, les anticorps brucelliques étant naturellement absorbés. Il s'agissait bien de coagglutinines imputables à la tularémie. Au reste, les médecins traitants à qui nous avons demandé des renseignements dont ils saisissaient tout l'intérêt, ne relevèrent dans les antécédents de ces 5 tularémiques aucun indice faisant présumer que ces malades avaient présenté à un moment donné une manifestation pathologique suspecte de brucellose, au moins sous forme apparente.

Nous n'avons pas confirmé le point de vue de Francis et Evans, qui voient une corrélation entre la présence des coagglutinines et la richesse des sérums en anticorps homologues. Ainsi, parmi 28 sérums dont le taux d'agglutination pour *P. tularensis* atteignait ou dépassait 1/5.000, 2 seulement agglutinaient les brucelles, comme l'indique le tableau sur lequel nous portons les taux respectifs d'agglutination de nos 5 sérums. Notamment, 6 sérums qui agglutinaient *P. tularensis* à 1/10.000 et 2 à 1/20.000 étaient dépourvus de co-agglutinines.

Il n'est pas sans intérêt de noter qu'une fois (sérum 1 a) le titre des agglutinines a été aussi élevé pour *P. tularensis* que pour *Br. abortus*. Francis et Evans avaient fait 3 observations semblables. Dans notre cas particulier, tandis que les anticorps tularémiques progressaient, les coagglutinines brucelliques étaient en décroissance (sérum 1 b). Cette constatation confirme bien que

TABLEAU I.

NUMÉRO DES SÉRUMS	<i>P. tularensis</i>	<i>Br. abortus</i>	<i>Br. melitensis</i>
1 { <i>a</i>	1/200	1/200	1/200
{ <i>b</i>	1/500	1/100	1/100
2	1/2.000	0	1/200
3 { <i>a</i>	1/4.000	1/100	1/100
{ <i>b</i>	1/10.000	1/300	1/100
4	1/5.000	1/100	1/100
5	1/2.000	1/100	1/100

Les sérums 1 et 3 ont été éprouvés deux fois sur des prélèvements *a* et *b* effectués à un mois d'intervalle au cours de la maladie. L'épreuve de la saturation concerne les sérums 1 et 4.

le titre de ces dernières n'est pas commandé par celui des agglutinines tularémiques spécifiques.

b) *Sérums animaux*. — Nous n'avons pu mettre en évidence de coagglutinines brucelliques dans le sérum de 5 chiens dont les taux d'agglutination vis-à-vis de *P. tularensis* étaient : 1/1.000, 1/100, 1/200, 1/50, 1/2.000. Ces animaux s'étaient infectés, sans faire de maladie apparente, en ingérant les viscères de lièvres qui étaient responsables de la tularémie de leurs propriétaires. Nous avons infecté expérimentalement au laboratoire un autre chien par le même procédé. Il ne présenta pas le moindre signe de maladie, bien que son sérum agglutinât après quinze jours *P. tularensis* à 1/2.000. Absence également de coagglutinines brucelliques. Le sérum de ce chien, comme celui de plusieurs chiens normaux, avait été, avant l'expérience, reconnu dépourvu d'anticorps tularémiques.

Des sérums de lapins préparés par injection de suspensions de *P. tularensis* tuées par chauffage agglutinaient ce germe aux taux de 1/1.000 et 1/2.000, mais étaient négatifs vis-à-vis des brucelles. Deux lapins inoculés, l'un sous la peau, l'autre dans le derme, avec une souche virulente, agglutinaient *P. tularensis* à 1/2.000 et 1/1.000 après quinze jours. Le premier agglutinait *Br. melitensis* à 1/100, le second à 1/50.

2° AGGLUTININES TULARÉMIQUES DANS LES SÉRUMS BRUCELLIQUES. — S'il est admis qu'un taux d'agglutination de 1/100 confirme de façon absolue une tularémie, les titres inférieurs ont une toute autre signification que dans le séro-diagnostic de Wright. La spécificité des anticorps tularémiques n'a, jusqu'à présent, jamais été

discutée, et, entre la première et la deuxième semaine de la maladie, une agglutination à 1/10 ou 1/20 a une valeur certaine. Le titre s'élève rapidement pour atteindre 1/100 et plus après la troisième semaine. Il persiste à un taux très appréciable durant des années, d'après les auteurs américains ; pour notre part, nous l'avons trouvé inchangé chez d'anciens malades après quinze mois. Par contre, hormis les 154 cas de tularémie confirmés au laboratoire, notre pratique porte sur 426 sérums, dans lesquels nous n'avons pas trouvé la moindre trace d'agglutinine tularémique, et il n'y eut jamais contestation entre le laboratoire et la clinique à leur sujet ; la tularémie était hors de cause.

Sur ces données, la brucellose constitue l'unique exception connue, car nous avons mis en évidence six fois des coagglutinines tularémiques dans les sérums de 12 malades atteints de brucellose (tableau II).

TABLEAU II.

NUMÉRO DES SÉRUMS	<i>Br. melitensis</i>	<i>Br. abortus</i>	<i>P. tularensis</i>
1	1/200	1/200	0
2	1/200		1/50
3	1/500	1/1 000	1/150
4	1/100	1/100	1/10
5	1/500	1/500	0
6	1/200	1/200	1/10
7	1/100		0
8	1/1 000		1/150
9	1/1 000		1/30
10	1/100		0
11	1/100		0
12	1/300		0

Nous confirmons donc pleinement les conclusions de Francis et Evans quant à la fréquence relative de ces coagglutinines. Comme l'épreuve de l'absorption avait éliminé l'éventualité de la coexistence d'une brucellose et d'une tularémie dans la mise en évidence des coagglutinines brucelliques, l'épreuve répondit dans le même sens pour les agglutinines tularémiques dans la brucellose. Francis et Evans l'avaient souligné, tout en admettant la possibilité de cette association dans l'avenir. Dans le sérum n° 8, dont le titre en agglutinines tularémiques était particulièrement élevé, celles-ci furent complètement absorbées par l'antigène brucellique. Elles n'étaient donc pas spécifiques et répondaient bien à la définition des coagglutinines.

Ajoutons enfin que dans 3 sérums antibrucelliques expérimentaux (lapin) — que nous devons à l'amabilité de notre collègue J. Gallut — nous n'avons décelé de coagglutinines, au faible taux

de 1/10, que dans un sérum anti-*abortus* qui agglutinait ce germe à 1/10.000. Un sérum anti-*melitensis* à 1/1.000, un sérum anti-*abortus* à 1/5.000 n'en contenaient pas trace.

DISCUSSION ET CONCLUSION.

Il n'est pas contestable qu'il existe entre les agents étiologiques de la tularémie et des brucelloses des communautés antigéniques responsables des coagglutinines présentes dans le sérum de sujets qui ont subi l'atteinte de l'une ou l'autre de ces infections. En ce qui concerne les coagglutinines brucelliques, nous les décelons dans un nombre restreint de sérums tularémiques ; il se situe autour de 3 p. 100, chiffre dix fois plus faible que celui donné par les auteurs étrangers (37 p. 100 pour Francis et Evans). Nous avons donné les raisons de ces divergences. Nous nous inspirons, comme la plupart de nos collègues français, des travaux de L. Nègre et M. Raynaud qui ont conduit à ne prendre en considération, dans le séro-diagnostic de Wright, qu'un titre d'agglutination voisin de 1/100.

Cette réserve faite, la notion fondamentale demeure et un séro-diagnostic brucellique qualifié de positif se rencontre dans la tularémie. En pratique courante, l'épidémiologie et la clinique évitent toute confusion. Cependant, nous commençons à connaître, avec l'extension de la tularémie en France et la dispersion du virus dans la nature, des cas où la source du contagement n'apparaît pas à l'évidence et où la maladie revêt une forme dite « septicémique », sans adénopathies, dont l'évolution affecte un caractère bénin ou plus ou moins sévère, sans jamais être mortel à notre connaissance (contamination par la voie des muqueuses buccale, nasale ou oculaire par des poussières infectées, par exemple, ou, dans les laboratoires, par des cultures ou du matériel de provenance animale). L'épreuve de la saturation des agglutinines pourra s'imposer pour donner au test sérologique sa véritable interprétation.

Plus fréquemment, d'après nos constatations en accord avec celles de Francis et Evans, on hésitera à se prononcer quand, à un taux quelconque, des agglutinines tularémiques seront mises en évidence dans le sérum d'un sujet présumé atteint de brucellose. Si là encore l'épidémiologie et la symptomatologie ne laisseront le plus souvent guère place à l'équivoque, la possibilité de brucelloses avec adénomégalies n'est pas exclue. Les observations rapportées par M. Janbon et L. Bertrand en 1949 retiennent l'attention [5]. Si la tularémie n'a pas jusqu'à présent gagné les départements méridionaux, elle coexiste avec la brucellose dans la région de l'est, et rien ne semble, *a priori*, s'opposer à son

extension à tout le territoire métropolitain, y compris la Corse. On peut concevoir, parmi les situations susceptibles de se rencontrer, une tularémie chez un ancien brucellique ou une brucellose chez un ancien tularémique, avec une certaine analogie dans les modalités symptomatiques et évolutives des deux maladies. Le sérologiste doit en être averti pour procéder aux investigations nécessaires qui préciseront la nature de la maladie « actuelle », à moins que l'isolement par culture de l'agent étiologique dissipe toute incertitude. Janbon et Bertrand soulignent le parti qu'ils ont tiré de l'adénoculture dans la brucellose. L'avantage n'est pas moindre dans les formes ulcéro-ganglionnaires ou ganglionnaires pures de la tularémie [6]. Au surplus, les communautés antigéniques qui provoquent les agglutinations croisées n'entraînent pas pour autant de processus d'immunisation croisée, comme la preuve vient de nous en être donnée chez un malade du service du D^r R. Martin à l'hôpital Pasteur. L'intérêt doctrinal de cette constatation sera exposé dans une communication ultérieure.

Enfin, les tests intradermiques à la mélitine et à la tularine, qui sont rigoureusement spécifiques, comme l'ont récemment rappelé V. de Lavergne et coll., seront, dans les cas douteux, un élément de discrimination précieux [7].

La documentation, base de ce travail, était déjà rassemblée quand nous avons pris connaissance de l'article de L. Carrère et H. Quatrefages sur le séro-diagnostic de Wright [8]. Pratiquée avec la souche P 900 et suivant la technique du C. R. F. O. de Montpellier, la réaction aurait déjà une signification au taux de 1/40 et serait strictement spécifique à 1/80. Dans ces conditions, nos observations risquaient de n'avoir plus qu'un intérêt historique.

Il nous restait en glacière un peu des sérums tularémiques 1,4 et 5 (cf. tableau I). Nous avons demandé à notre collègue quée avec la souche P 900 et suivant la technique du C. R. F. O. qu'il reçoit prêt à l'emploi pour les besoins de son laboratoire. Nous le remercions de son obligeant concours. Les résultats n'ont pas différé dans le fond de ceux précédemment constatés. Le taux d'agglutination a été pour chacun de ces sérums de 1/160, agglutination avec éclaircissement total (+ + + selon le mode d'expression du C. R. F. O.). Nous avons trouvé 1/200, 1/100, 1/100 avec l'antigène de l'Institut Pasteur.

Sans vouloir discuter le bien-fondé de la thèse de Carrère et Quatrefages en raison de notre incompétence pour ce qui ne ressort pas de notre préoccupation présente, il nous faut reconnaître que la tularémie, dont les auteurs ne font pas mention, constitue bien une exception qui tempère la rigueur de leurs conclusions, par trop absolues.

RÉSUMÉ.

Le problème des agglutinations croisées entre la tularémie et la brucellose est évoqué sous ses diverses incidences. Compte tenu de la présence fréquente d'agglutinines brucelliques dans des sérums normaux ou pathologiques, ces anticorps hétérologues ne prennent de signification dans la tularémie qu'au titre minimum de 1/100, avec un sérum inactivé à 56°. Nous les mettons en évidence dans environ 3 p. 100 des sérums de sujets atteints de tularémie, sans qu'apparaisse un rapport quantitatif entre ces coagglutinines et les anticorps homologues.

Dans la brucellose, des coagglutinines tularémiques sont plus souvent rencontrées à des taux généralement bas, mais qui ont leur valeur puisque dans aucun sérum normal ou pathologique, autre que les sérums brucelliques, on ne les a pas jusqu'à présent signalées.

Le sérologiste devra avoir ces notions présentes à l'esprit dans la pratique du séro-diagnostic de la tularémie et de la brucellose chez l'homme et l'interprétation des résultats dans des cas complexes dont des exemples sont donnés.

Nous exprimons notre vive gratitude à MM. Thierry et Salomon, du Service de Recherches vétérinaires à Alfort, qui ont bien voulu procéder, au début de nos recherches, au séro-diagnostic brucellique d'un certain nombre de sérums tularémiques, ainsi qu'au professeur R. Sohier, de qui nous tenions plusieurs sérums de sujets atteints de brucellose.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. FRANCIS et A. EVANS. *Publ. Health Rep.*, 1926, **41**, 1273-1295.
- [2] S. GOLEM. *Rev. turque Hyg. Biol. exp.*, 1944, **4**, 34-53.
- [3] R. M. TOVAR. *Proceed. Soc. exp. Biol.*, 1946, **62**, 67-69.
- [4] L. NÈGRE et M. RAYNAUD. *Presse méd.*, 1911, 681-683.
- [5] M. JANBON et L. BERTRAND. *Presse méd.*, 1949, n° 74, 1082.
- [6] G. GIRARD. *Ces Annales*, 1950, **78**, 786.
- [7] V. DE LAVERGNE, HELLUY, BEUREY et DORNIER. *Bull. Acad. nat. méd.*, 1950, **134**, 135.
- [8] L. CARRÈRE et H. QUATREFAGES. *Presse méd.*, 1950, n° 29, 518.

**ASSOCIATION DE L'ANTIGÈNE MÉTHYLIQUE
ET DE LA STREPTOMYCINE
DANS LE TRAITEMENT
DE LA TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE DE LA SOURIS**

par C. LEVADITI, A. VAISMAN et H. CHAIGNEAU.

*(Institut Alfred-Fournier,
Institut national d'Hygiène et Caisse nationale
de la Sécurité sociale.)*

Dans un remarquable travail publié récemment, L. Nègre [1] démontre, par des essais effectués soit sur le cobaye, soit sur le lapin, que lorsqu'on associe l'antigène méthylique (préparé par l'auteur [2]) à la streptomycine, les effets antituberculeux observés se révèlent supérieurs à ceux obtenus par l'usage séparé de ces deux médicaments. « Chez tous les animaux tuberculeux traités, l'antigène méthylique et la streptomycine associés, affirme Nègre, ont été trois fois plus efficaces que cet antibiotique injecté seul, aussi bien lorsque l'antigène méthylique n'a pas manifesté d'action propre (cobayes), que lorsqu'il a agi par lui-même. »

Étant donné l'importance de ces conclusions, nous avons entrepris des essais analogues sur la souris tuberculisée, avec l'espoir que les résultats enregistrés confirmeraient les constatations de Nègre. Hélas ! il n'en a rien été. Ce qui paraît être vrai lorsqu'on expérimente sur le cobaye ou le lapin, ne l'est pas quand les essais portent sur la souris. Cela se comprend d'ailleurs, compte tenu des caractères dissemblables de l'infection bacillaire du cobaye et du lapin d'une part, et de celle, térébrante et rapidement mortelle, de la souris, d'autre part. Nous estimons toutefois utile, à titre indicatif, de résumer dans la présente note l'ensemble de nos investigations.

TECHNIQUE. — 80 souris ont servi à nos expériences. Un premier lot sert de témoins, infectés mais non traités. Un second, également contaminé (1 mg. de B. K. souche H 512, par voie intraveineuse) reçoit 200 U. de streptomycine quotidiennement et par voie sous-cutanée (au total 6.400 U.), dose inférieure à celle nettement curative [3]. Un troisième lot est traité par l'antigène

méthylrique, administré sous la peau, à la dose de 0,25 cm³ par animal, à raison de deux injections par semaine (et cela pendant trois semaines). Un quatrième lot est traité journellement par 200 U. de streptomycine et reçoit, en outre, de l'antigène bi-hebdomadairement (au total 6.400 U. de streptomycine, puis 1,5 cm³ d'antigène avant la contamination tuberculeuse et 2,5 cm³ après).

RÉSULTATS. — 1° *Souris témoins*. — Mortalité (entre vingt et trente-quatre jours) : 100 p. 100. Lésions pulmonaires intenses (entre + + + et ∞) : 100 p. 100. Bacillose pulmonaire entre + + + + et ∞ : 100 p. 100.

Donc infection tuberculeuse massive et constamment mortelle.

2° *Souris traitées par la streptomycine seule*. — Mortalité (entre dix-huit et vingt-sept jours) : 23 p. 100. Survie jusqu'au trente-huitième jour (temps limite de nos observations) : 77 p. 100. Altérations microscopiques pulmonaires : entre + — — et + — 14 p. 100 ; entre + + et + + + : 86 p. 100. Il s'agit généralement de lésions d'alvéolite plus ou moins localisées, avec présence fréquente de cellules granulo-adipeuses contenant, çà et là, des bacilles en voie d'involution. Bacillose pulmonaire : de + — à + : 45,0 p. 100 ; de + + à + + + + : 54,5 p. 100.

En bref, effet curatif manifeste quant à la survie des animaux, mais activité antibacillaire nettement inférieure à celle que l'on observe chez les souris traitées par la dose réellement efficace de 1.000 à 2.000 U. de streptomycine.

3° *Souris traitées par l'antigène méthylrique seul avant et après l'infection bacillaire*. — Mortalité [entre le quatorzième et le vingt-neuvième jour (maximum entre le dix-huitième et le vingt-troisième)] : 100 p. 100. Altérations microscopiques pulmonaires : de + à + + : 15,75 p. 100 ; de + + + à ∞ : 84,25 p. 100. Il s'agit, dans la majorité des cas, de lésions nécrotiques diffuses, très riches en bacilles de Koch. Taux bacillaire : + : 5,5 p. 100 ; + + à ∞ : 94,5 p. 100.

Il en résulte que l'antigène méthylrique seul, administré avant et après la contamination tuberculeuse, n'exerce aucun effet préventif ou curatif sur l'évolution de la maladie, comme le prouvent la mortalité très élevée (100 p. 100) et les caractères souvent térébrants du processus, ainsi que le taux élevé de la bacillose pulmonaire.

4° *Souris traitées par l'association antigène méthylrique-streptomycine* (antigène administré avant et après la contamination). — Mortalité (entre quatorze et dix-sept jours) : 25 p. 100. Survie : 75 p. 100. Lésions microscopiques pulmonaires : + : 34 p. 100 ; + + à + + + + : 66 p. 100. Ces lésions consistent (comme chez les animaux traités par la streptomycine seule) en des plaques d'alvéolite comportant des cellules granulo-adipeuses renfer-

mant des bacilles en voie d'involution. Taux de la bacillose pulmonaire : + — à + : 42 p. 100 ; + + à + + + + : 58 p. 100.

Ces résultats montrent que l'association antigène méthylique et streptomycine n'exerce pas des effets préventifs et curatifs supérieurs à ceux constatés chez les souris traitées par la streptomycine seule, utilisée à des doses infra-thérapeutiques.

L'ensemble de nos constatations se trouve résumé dans le tableau I.

TABLEAU I.

MÉDICATION	MORTALITÉ p. 100	LÉSIONS MICROSCOPIQUES pulmonaires p. 100		BACILLOSE PULMONAIRE p. 100	
		+ — — à +	++ à +++	+ — à +	++ à ++++
Streptomycine seule.	23,0	14,0	86,0	45,5	54,5
Antigène méthylique seul.	100	+ à ++	+++ à ∞	+	++ à ∞
		15,75	84,25	5,5	94,5
Antigène méthylique + streptomycine.	25,0	+	++ à ++++	+ — à +	++ à ++++
		34,0	66,0	42,0	58,0
Néant ou moins.	100	+++ à ∞		++++ à ∞	
		100		100	

CONCLUSIONS. — Contrairement à ce que l'on constate chez le cobaye ou le lapin tuberculisé, l'adjonction de l'antigène méthylique de Nègre ne semble pas favoriser nettement, chez la souris, les effets préventifs et curatifs de la streptomycine utilisée à des doses infra-thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] NÈGRE (L.). *Ces Annales*, 1950, **78**, 435.
- [2] NÈGRE et BOQUET. *Antigénothérapie de la Tuberculose par les extraits méthyliques de bacilles de Koch*. Masson, éditeur, Paris, 1927 ; *Traitement de la tuberculose par l'antigène méthylique*, même éditeur, 1932.
- [3] LEVADITI (C.) et VAISMAN (A.). *Ces Annales*, 1950, **78**, 407.

AGGLUTINATION DES LEPTOSPIRES, EN PARTICULIER DE *L. POMONA*, PAR LES SÉRUMS DE PORCS,

par B. KOLOCHINE-ERBER et M. COLLOMBIER.

(Institut Pasteur. Service du D^r DUJARRIC DE LA RIVIÈRE.)

La découverte par Gsell, en 1944 [1], du rôle de *Leptospira pomona* dans la maladie des porchers, a été confirmée par d'autres auteurs et les résultats sérologiques publiés ont donné toute leur valeur aux observations faites à Saint-Gall.

En France, le premier exemple d'un malade ayant un séro-diagnostic positif pour *L. pomona* fut trouvé dès 1945, mais l'observation de ce cas ne fut pas divulguée car rien ne permettait de retrouver, dans le passé du malade, un contact avec des porcs (1). D'autres observations ont été publiées depuis (Siguier et Poulet (1947) [2]; Boulet, Serre, Passouant, Valat, Latour et Izarn (1949) [3]; Plauchu et Viallier (1950) [4]; Boquien, Kolochine-Erber, Hervouet et Duhamel (1950) [5]); d'autres cas sont encore inédits.

La présence d'agglutinines pour *L. pomona* dans le sérum des porcs provenant de régions où la maladie humaine est connue a été rapportée par Gsell dès 1944 [1], puis par d'autres auteurs : Bernkopf et Olitzki (Palestine), Collier (Indes Néerlandaises), Johnson (Australie) [6], le dernier mémoire publié est celui de Babudieri [7] qui expose les résultats obtenus en Italie. Les séro-diagnostic sont négatifs avec les sérums des porcs élevés dans des régions où la maladie des porchers est inconnue, comme l'ont montré Gsell et Rimpau pour Munich [8], van Thiel en Hollande (1946) [9].

L'infection expérimentale du porc a été obtenue dès 1945 par Schmid et Giovanella [10]; elle a montré en particulier l'importance de la leptospiurie chez les animaux inoculés et la contamination facile des porcs sains vivant au voisinage des animaux

(1) Ce que Babudieri et ses collaborateurs ont publié au sujet de la présence de *L. pomona* chez le rat, le chien, chez un bovin, pourrait peut-être éclairer l'histoire de ce premier malade, qui n'était pas un citadin.

malades, contamination qui se traduit par l'apparition d'agglutinines et de leptospiurie.

★★

A l'Institut Pasteur, dans le laboratoire des leptospiroses, des séro-diagnostic pour le *L. pomona* ont été faits avec des sérums de pores de 1947 à 1949. Les sangs étudiés provenaient du Centre de prélèvements biologiques du Service Vétérinaire de la Seine, d'une usine de produits de charcuterie de la région parisienne, de la porcherie du Centre hospitalier régional de Nantes, d'un élevage particulier de Seine-et-Oise. Sauf pour les derniers, le sang avait été pris au moment de l'abatage. Les pores examinés par les Services vétérinaires étaient en bonne santé, aucune lésion n'était relevée au cours de l'autopsie. Pour les pores qui séjournaient depuis quelques mois dans une porcherie rien n'avait été observé par les vétérinaires et par les gardiens chargés de la surveillance du troupeau (cas de la porcherie de Nantes).

L'agglutination a été recherchée d'abord pour *L. pomona australis* C, pour un *L. pomona* de la collection du Dr Gsell et un autre *L. pomona* isolé par le professeur Babudieri (*L. pomona mezzano*). Les résultats fournis par ces 3 souches étant tout à fait concordants, c'est la première qui a été adoptée pour presque tous les séro-diagnostic. De plus, pour quelques sérums, le séro-diagnostic a été recherché pour *L. ictero-hemorrhagiae*, *L. grippo-typhosa*, *L. canicola*, *L. Sejroe*, *L. bataviae*, *L. mitis*. Cette seconde série d'investigations avait pour but de mettre éventuellement en évidence la présence d'agglutinines pour d'autres leptospires que pour *L. pomona* et de rechercher les coagglutinines.

En tout 172 échantillons de sérum ont été examinés ; 87 d'origine inconnue, 85 d'origine connue : Guingamp (Côtes-du-Nord), Evron (Mayenne), Saint-Hilaire-du-Harcouet (Manche), un élevage particulier de Corbeil, la porcherie de l'Hôpital de Nantes.

Les examens montrèrent immédiatement que des lots de sérums donnaient des séro-diagnostic positifs, d'autres des réponses négatives : il ne s'agissait donc pas de cas isolés de pores ayant répondu à une contamination par *L. pomona*, mais de l'infection presque massive de porcheries puisqu'un séro-diagnostic négatif était rare dans un lot à séro-diagnostic positifs ou, même, faisait défaut. Dans ces conditions, établir des pourcentages d'après la totalité des sérums est erroné. Il est préférable de présenter des moyennes dans les groupes de sérums ; cependant, c'est seulement l'ensemble des sérums provenant de la porcherie des hôpitaux de Nantes qui pourra servir à établir quelques pourcentages parce que le nombre de sérums examinés est assez élevé.

I. — Parmi les 87 sérums d'origine inconnue, 3 lots seulement

sont à retenir, les 6 autres ayant donné des réponses négatives pour le séro-diagnostic à *L. pomona australis* C et les 2 autres souches de *L. pomona*. L'ensemble de ces 3 lots comprenait en tout 22 échantillons (février-mars 1947) : 2 négatifs, 4 ayant leur limite au 1/100, 3 au 1/1.000, 11 du 1/10.000 au 1/50.000, 2 au 1/100.000. Cela pour les 3 souches de *L. pomona*. Il est à remarquer que les taux d'agglutination peuvent être beaucoup plus élevés dans le sérum des porcs que dans le sérum de sujets atteints de maladie des porchers. Pour ces derniers la limite se place en général à un taux beaucoup plus faible : 1/2.000 et 1/5.000 sont les limites ordinaires, 1/10.000 et au delà sont plus rares. Cependant, le nombre relativement bas de sérums humains étudiés ayant donné une réponse positive ne permet pas de conclure fermement.

Dans ce groupe de 87 porcs, parmi ceux dont le séro-diagnostic était négatif pour *L. pomona*, des agglutinines pour *L. bataviae* ont été décélées dans deux groupes comprenant en tout 9 échantillons (mars 1947) : l'un des séro-diagnostic atteint 1/10.000, pour 4 la limite est légèrement supérieure à 1/1.000, pour 2 autres elle dépasse un peu le 1/100 ; deux porcs donnent une réponse négative pour toutes les espèces. Dans les autres lots, aucun résultat n'a été significatif, sauf pour un sérum qui a agglutiné *L. canicola* à 1/1.000.

Pour les sérums positifs cités plus haut, quelques cas particuliers sont à retenir. Plusieurs échantillons ont agglutiné *L. ictero-hemorrhagiae* et *L. grippo-typhosa* au 1/100 ou au 1/1.000 ; il s'agit probablement de coagglutinines parce que le taux d'agglutination pour *L. pomona* était alors le plus élevé. Dans quelques exemples, le taux d'agglutination a été le même pour les 3 souches (1/10.000). Doit-on penser que l'on observe chez le porc ce que l'on note dans la plupart des leptospiroses humaines et qui est particulièrement net dans la leptospirose ictéro-hémorragique ? Quand les anticorps commencent à apparaître, l'agglutination est semblable pour plusieurs espèces, jusqu'à une limite relativement faible mais, quelques jours plus tard, les caractères se précisent et l'agglutination du leptospire responsable, accompagnée de lyse, atteint la limite propre à l'espèce, tandis que les agglutinines des autres espèces restent stables, ou même rétrocedent largement, ce qui met en évidence leur qualité de coagglutinines. Ces détails sont acquis dans la maladie humaine, par des séro-diagnostic successifs d'un même sujet, ce qui ne pouvait être fait pour les porcs, saignés à l'abatage. L'existence de ces taux d'agglutination égaux implique-t-elle qu'il s'agit du début de la contamination du porc, de coagglutinines persistantes, ou d'une infection multiple ? Les conditions de la recherche interdisent de donner une réponse.

II. — Les 85 sérums d'origine connue sont répartis en 5 lots dont 4 ont donné des réponses négatives. Un seul groupe est à retenir : celui des porcs de la porcherie des hôpitaux de Nantes. Cet ensemble, qui comprend 7 envois, a permis d'examiner 51 sérums, du 27 décembre 1948 au 7 avril 1949. Pour 9 sérums le séro-diagnostic a été négatif, 9 ont fourni une réponse inférieure ou égale à 1/1.000, 5 ont agglutiné *L. pomona* entre 1/1.000 et 1/10.000 ; le taux limite de 1/10.000 a été donné par 9 sérums, il a été supérieur pour 19 sérums. Pour l'ensemble de ce lot, le plus important, il est possible de parler de moyennes : le nombre de séro-diagnostics dont la réponse a été supérieure à 1/1.000 est de 66 p. 100 et, si l'on considère les résultats de 1/100 à plus de 1/10.000, le taux devient 84 p. 100.

Les sérums de ces porcs mis en présence des autres leptospires ont donné des réponses négatives ou des résultats très faiblement positifs que l'on doit rapporter à la présence de coagglutinines. Le séro-diagnostic pour *L. mitis* a été recherché pour 10 sérums : les réponses ont été négatives.

Quelques faits augmentent l'intérêt des réponses de ce lot : deux hommes, qui travaillaient dans la porcherie, ont été hospitalisés pour une leptospirose et leur séro-diagnostic fut positif pour *L. pomona* [5]. Les porcs séjournaient environ huit mois dans la porcherie ; ils étaient surveillés par un vétérinaire, ils n'avaient jamais été en contact avec des porcs de contrées où la maladie des porchers est connue, ni avec d'autres animaux des environs, ils étaient nourris avec des sous-produits laitiers provenant de la région : c'est donc un foyer de leptospirose porcine qui se trouve décelé dans l'Ouest de la France où la maladie des porchers était ignorée.

En France, la maladie des porchers était connue en Haute-Savoie, près de la frontière suisse, dans le Jura, la région lyonnaise depuis la description donnée par Bouchet (Cruseilles, 1935) [11], les cas publiés par Charleux (Annemasse, 1936-1937) [12], le cas rapporté par Bocca (Saint-Etienne, 1936) [13] ; Cayla la trouve dans la région de l'Aubrac en 1938 [14]. Elle existe aussi dans la région parisienne (Coste, Morin et Hardel, 1941) [15].

Mais, si les cas humains étaient connus cliniquement, aucune démonstration biologique ne pouvait être donnée à cette époque : le rôle du porc paraissait acquis, mais l'agent spécifique réel était inconnu. Le mémoire de P. Durand, P. Giroud, Larrivé et Mestrallet [16] semblait mettre la question au point, mais la présence d'un ultravirus, que ces auteurs avaient cru isoler, n'expliquait pas tout. La thèse de Lavabre expose l'aspect de la question sans apporter de fait nouveau [17].

Les observations récemment publiées démontrent une fois de

plus la valeur spécifique de *L. pomona* dans la maladie des porchers, le rôle du porc dans l'infection humaine, précisent la présence de la maladie dans la banlieue de Lyon [4], la région parisienne (Ivry-sur-Seine [2]), apportent de nouvelles localisations : région méditerranéenne (mais aucun examen de sangs de porcs n'a été fait à propos de ce cas [3]), région nantaise [5].

Il est probable que dans d'autres parties de la France seront décelés des foyers de leptospirose porcine et humaine. Les résultats seront sans doute acquis lentement parce que les porcs ne sont pas réellement malades et que l'homme présente le plus souvent une maladie légère, une sorte de « grippe », pour laquelle un examen médical paraît inutile.

★
★ ★

En résumé, les recherches qui sont exposées ici apportent un certain nombre de faits :

1° Il existe en France des foyers de leptospirose porcine décelés par des séro-diagnostic positifs pour le *L. pomona australis* C et d'autres souches de *L. pomona* dans le sérum de porcs. Quelques exemples de séro-diagnostic positifs pour *L. bataviae* laissent à penser que ce leptospire pourrait jouer un rôle chez le porc (2).

2° Dans les foyers de leptospirose du porc la contamination est massive.

3° Deux cas de maladie humaine ont été trouvés dans l'un de ces foyers. La maladie des porchers est une maladie professionnelle.

4° L'étude de sérums de porcs d'origine connue permet d'ajouter un nouveau centre de leptospirose porcine à ceux déjà marqués sur la carte de France : sa situation à Nantes, dans l'ouest du pays, très éloignée des autres régions contaminées, qui semblaient bien délimitées, permet de dire qu'on doit trouver en d'autres points du territoire français des porcheries contaminées et des cas de maladie des porchers. Un commencement de démonstration en est peut-être donné par la présence de séro-diagnostic positifs dans 3 lots de sérums de porcs d'origines inconnues et par la mise en évidence d'un cas de maladie humaine dans la région méditerranéenne [Lunel (Hérault)].

(2) Pour près de 150 sérums humains reçus par le laboratoire des leptospiroses, le séro-diagnostic pour *L. bataviae* a été recherché. Aucune réponse significative n'a été enregistrée, jusqu'à maintenant, pour les malades de la métropole.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] O. GSELL. *Bull. Schweizer. Akad. med. Wissensch.*, 1944, **1**, 67 ; *Presse méd.*, 1945, 525 ; *Schweizer. med. Wochenschr.*, 1946, n° 12, 237 ; *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1946, 688 ; *Rev. Path. comp.*, 1949, n° 608, 407-417.
- [2] F. SIGUIER et J. POULET. *Bull. Soc. méd. Hôp. Paris*, 1947, **63**, 797 ; *Paris méd.*, 21 août 1948, n° 31, 373.
- [3] P. BOULET, H. SERRE, P. PASSOUANT, G. VALAT, H. LATOUR et P. IZARN. *Soc. Sci. méd. biol. Montpellier*, 1949, in *Presse méd.*, 30 avril 1949, n° 29, 396.
- [4] M. FLAUCHU et J. VIALIER. *Lyon médical*, 1950, **183**, 33.
- [5] Y. BOQUIEN, B. KOLOCHINE-ERBER, D. HERVOUET et DUHAMEL. *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1950, **134**, 137.
- [6] BERNEKOFF et OLITZKI, JOHNSON, cités par Gsell, *Rev. Path. comp.*, 1949, n° 608, 415.
- W. A. COLLIER. *Schweizer. Med. Wochenschr.*, 1948, **78**, 508.
- [7] B. BABUDIERI. *Rendiconti Ist. sup. Sanità*, 1949, **12**, 937.
- [8] O. GSELL et W. RIMPAU, cités par Gsell, *Rev. Path. comp.*, 1949, n° 608.
- [9] P. H. VAN THIEL. *Ned. Tsch. v. Gen.*, 1946, **90**, 468 ; *The Leptospirose*, 1 vol., Universitaire pers. Leiden, Leiden, 1948, 157.
- [10] G. SCHMID et R. GIOVANELLA. *Arch. Thierheilk.*, 1947, **89**, 1.
- [11] H. BOUCHET. *Boll. Atti R. Accad. di Roma*, séance du 30 novembre 1935. Relation sur la pseudo-typhoméningite des porchers. Imprimerie Hérisson, Annecy, 1935.
- [12] G. CHARLEUX. *Soc. méd. Hôp. Lyon*, 4 février 1936 ; *Presse méd.*, 24 mars 1937, n° 24.
- [13] FOCCA. *Soc. méd. Hôp. Lyon*, 24 novembre 1936.
- [14] J. CAYLA. *Thèse Fac. méd.*, Paris, 1938.
- [15] F. COSTE, M. MORIN et M. HARDEL. *Bull. Soc. méd. Hôp. Paris*, 1941, **57**, 713.
- [16] P. DURAND, P. GIROUD, E. LARRIVÉ et A. MESTRALLET. *C. R. Acad. Sci.*, 1936, **203**, 957 et 1032 ; *ibid.*, 1937, **204**, 830 ; *Arch. de l'Institut Pasteur de Tunis*, 1937, **26**, 213.
- [17] P. LAVABRE. *Thèse Fac. méd.*, Lyon, 1937.

A PROPOS DE L'EMPLOI DE LA CELLULOSE PRÉCIPITÉE POUR L'ÉTUDE DES BACTÉRIES CELLULOLYTIQUES

par J. POCHON, Y. T. TCHAN, T. L. WANG et J. AUGIER.

(Institut Pasteur. Laboratoire de Microbie technique.)

A la suite des premiers chercheurs qui se sont attaqués au problème de la fermentation bactérienne de la cellulose, et en particulier à la suite des travaux d'Omeliansky [1], c'est surtout au papier filtre que l'on s'est pendant longtemps adressé comme source de cellulose, l'attaque de ce substrat étant considérée comme test de la cellulolyse. Mais les difficultés rencontrées pour l'isolement des souches, en raison de l'impossibilité d'incorporer ce type de cellulose à la gélose de façon homogène, incitèrent des auteurs à modifier la structure fibreuse de la cellulose par voie chimique. C'est ainsi que Kellermann et son école [2] préconisèrent la cellulose traitée par l'acide sulfurique ou la liqueur de Schweitzer ; on peut alors obtenir une gélose où la cellulose est sous forme de suspension homogène, ce qui est un avantage incontestable. Avec ce milieu, Kellermann, Scales, Mc Beth, ont isolé un grand nombre de germes cellulolytiques. Cependant ces milieux semblent peu favorables à l'isolement direct des germes à partir de la terre et les souches ainsi obtenues perdent facilement leur pouvoir cellulolytique par passage sur les milieux ordinaires. Aussi Omeliansky et Pringsheim [3] ont-ils suggéré que les germes isolés n'étaient que des contaminants non cellulolytiques, les vrais cellulolytiques étant perdus lors des passages sur milieux ordinaires.

Winogradsky [4], en 1929, a vivement critiqué cette méthode à cellulose précipitée ; il n'admet pas que l'auréole claire apparaissant autour des colonies soit un test suffisant pour démontrer le pouvoir cellulolytique d'un germe isolé sur ce milieu. Même sur un milieu à l'hydrocellulose, gélosé à 2 p. 100, il n'obtient que rarement des cultures de B. cellulolytiques et en rejette l'emploi pour l'isolement. Par contre, il préconise le gel de silice recouvert d'une feuille de papier filtre qui présente de tels avantages que, pendant un certain temps, ce milieu est universellement utilisé pour l'isolement des B. cellulolytiques aérobies.

Cependant d'autres travaux (Stanier [5]) montrent que l'échec des isollements sur milieu à la cellulose précipitée incorporée à la gélose est vraisemblablement en rapport avec le fait que la

teneur en gélose est trop élevée et que cette dernière empêche les germes de venir en contact direct avec les particules de cellulose, condition *sine qua non* pour la culture des cellulolytiques. De fait, avec des concentrations plus faibles en gélose, le milieu étant plus facilement pénétrable, nous avons pu isoler une vingtaine de souches de *Cytophaga*, *Sporocytophaga* et *Cellvibrio*. Les mêmes résultats ont été obtenus par Harmsen, à la même époque. Il semble donc que la gélose à la cellulose précipitée, dans certaines conditions, puisse être utilisée pour l'isolement des B. cellulolytiques. En ce qui concerne les B. cellulolytiques anaérobies, c'est également à du papier filtre, immergé dans un milieu liquide, que l'on s'est adressé pendant fort longtemps pour l'isolement et la culture. Mais l'impossibilité d'obtenir des colonies isolées laisse toujours planer un doute sur la pureté des souches ainsi isolées. Récemment Hungate [6] a utilisé, ici aussi, la gélose à la cellulose précipitée, et il isole ainsi des espèces nouvelles dont *C. cellobioparvus* qui, cependant, perd assez vite son pouvoir cellulolytique sur milieux usuels ; par contre, *B. succinogenes*, isolé de la même façon, est stable dans ses propriétés. Cet auteur reconnaît cependant l'existence de plusieurs types de cellulose dans la nature.

Sijpensteijn [7] rencontre de grandes difficultés pour l'isolement des espèces sur le milieu de Hungate, les souches hautement purifiées sont peu cellulolytiques et cet auteur pense au rôle de contaminants associés pour élever le taux de cellulolyse. C'est d'ailleurs ce qui ressort nettement du travail d'Enebo qui met en évidence le rôle de l'association B. cellulolytiques + B. non cellulolytiques.

Nous avons nous-mêmes utilisé le milieu et la technique de Hungate pour l'isolement d'espèces *anaérobies* : nous ensemblons un milieu liquide minéral contenant du papier filtre avec des fibres provenant d'une feuille de papier qui a été enfouie dans la terre. Ce premier enrichissement nous donne une culture mixte très active sur le papier filtre. A partir de cette culture mixte, nous avons réalisé 120 isolements au micromanipulateur, l'ensemencement étant fait dans un milieu à la cellulose précipitée. Tous les résultats ont été négatifs. (Ces résultats confirment ceux de Tétrault.)

Sans passer par le micromanipulateur, nous avons obtenu très facilement, par contre, des colonies isolées sur milieu avec la technique de Hungate, mais le repiquage de ces colonies par écrasement sur papier filtre, ne nous a jamais donné de résultats positifs (50 essais). L'addition d'extrait de terre en milieu salin n'a pas été plus favorable. (A noter que ces expériences ont été réalisées avant que Hungate ait publié les derniers détails de sa technique.)

En ce qui concerne les *aérobies*, avec la technique de Stanier nous n'avons pas eu de difficultés pour l'isolement des *Cytophaga* et des *Cellvibrio*. Cependant nous avons observé que les germes de colonies entourées d'une auréole claire, mais n'ayant pas la morphologie de ces deux genres, ne peuvent ultérieurement être cultivés sur papier filtre. L'ensemencement direct de la terre sur fibre à la cellulose précipitée nous est apparu, par ailleurs, comme peu satisfaisant ; le milieu est le plus souvent envahi par des Champignons et des germes divers, d'où l'isolement des cellulolytiques classiques est extrêmement difficile.

De toutes ces observations, il ressort une notion précise : *la cellulose précipitée ne déclenche pas la même réaction microbienne, dans une flore mixte, que la cellulose fibreuse sous forme de papier filtre et certains germes se montrent capables de proliférer sur la première qui, ultérieurement, ne peuvent le faire sur la seconde.*

Quelle est la cause de cette différence ? Y a-t-il modification chimique de la cellulose au cours des traitements de précipitation ? Le traitement par les *acides* entraîne des modifications physico-chimiques : pouvoir réducteur, viscosité, aptitudes tinctoriales... Et cependant le diagramme aux rayons X serait semblable à celui de la cellulose non traitée.

Le traitement par la liqueur cupro-ammoniacale agit selon un processus mal connu. Il semble (Neale [8]) qu'il y ait formation d'un complexe. Cependant on admet que la réaction cellulose-cupro-ammoniacale n'est pas homogène. Les molécules de surface de la cellulose seraient d'abord attaquées, puis libérées ; l'attaque des molécules profondes serait plus tardive. S'il n'y a pas modification chimique, il y a au moins modification physique avec déroulement progressif des molécules de la cellulose fibreuse.

Si l'on veut obtenir de la cellulose précipitée, incorporable à la gélose, n'ayant pas été modifiée dans ses propriétés chimiques, il faut utiliser des moyens mécaniques jusqu'à obtention de particules du même ordre de grandeur que les bactéries.

Dans ce but nous avons broyé du papier filtre dans de l'eau, avec des billes de verre, pendant vingt-quatre heures. Comme le pH a tendance à s'élever, par libération des ions alcalins du verre, nous opérons en présence d'un excès de CO_2 (les tampons ne peuvent être employés car ils ont un effet agglutinant sur la suspension). Dans ces conditions nous obtenons une suspension de particules dont la dimension est de l'ordre de quelques μ . Cette suspension s'incorpore facilement à la gélose et peut également servir pour imprégner des plaques de silico-gel.

Il semblait qu'un tel milieu dût être idéal pour l'étude des germes cellulolytiques ; de fait, avec des souches pures, on obtient des cultures très satisfaisantes de *Cytophaga* et de *Cell-*

vibrio. Mais, pour l'isolement des souches à partir de la terre, il se révèle d'une utilisation difficile : les plaques sont envahies par des moisissures et des germes divers et nous n'avons pu observer la prolifération des cellulolytiques classiques. Les résultats sont donc les mêmes qu'avec la cellulose précipitée.

Ce fait semble paradoxal car les modifications chimiques de la cellulose ont été réduites au minimum. Il est vraisemblable que la structure physique de la fibre doit jouer un grand rôle. D'ailleurs on sait parfaitement que, dans une culture en cellulolyse, on trouve toujours la majorité des germes fixés sur les fibres et, dans une culture en milieu liquide contenant une suspension de cellulose précipitée ou broyée on note, dès le début, une agglutination des particules chargées de germes. Il est donc vraisemblable que, en concurrence vitale, les B. cellulolytiques, pour se développer, doivent trouver des fibres dans des conditions physiques bien spéciales et que, en particulier, une diminution des dimensions de ces fibres leur soit défavorable.

Mais on doit alors considérer que les recherches effectuées avec le papier filtre ne réalisent pas exactement les conditions naturelles car la fibre du papier filtre n'a plus la même constitution physique que la fibre originelle (1). Il faudrait tenir compte de ce fait dans l'interprétation des expériences classiques et ne pas trop se hâter de conclure des essais de laboratoire aux phénomènes naturels. On sait de plus que, suivant les substances qui sont associées à la fibre elle-même (lignine ou, au contraire, héli-cellulose) dans le tissu végétal, la facilité et la rapidité de la cellulolyse varient du tout au tout. Il nous semble donc que le problème serait à reprendre sur des bases nouvelles, avec des substrats nouveaux, ce qui permettrait peut-être de concilier les opinions contradictoires actuellement relevées dans la littérature, qui font de la question de la cellulolyse bactérienne une des plus obscures de la microbiologie du sol et du tube digestif des herbivores et ruminants (2).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] OMELIANSKY. *Zentralbl. Bakt.*, II, 1902, 8, 193.
- [2] KELLERMANN. *Zentralbl. Bakt.*, II, 1912, 34, 486.

(1) C'est ainsi que Sijpensteijn a noté que certains cocci isolés de la panse attaquent énergiquement le papier mais sont sans action sur la cellulose du coton.

(2) Ce mémoire était déjà sous presse quand nous avons pu avoir connaissance du travail de E. T. Reese et al. (*J. Bact.*, 1950) qui met justement en évidence le comportement différent des microorganismes vis-à-vis de la cellulose fibreuse ou régénérée et en donne une explication biochimique et enzymatique très séduisante.

- SCALES. *Zentralbl. Bakt.*, II, 1915, **44**, 661.
Mc BETH. *Zentralbl. Bakt.*, II, 1914, **39**, 502.
[3] OMELIANSKY. *Zentralbl. Bakt.*, II, 1913, **36**, 472.
FRINGSHEIM. *Zentralbl. Bakt.*, II, 1913, **36**, 309.
[4] WINOGRADSKY. *Microbiologie du sol* (Masson, Paris, 1950).
[5] STANIER. *J. Bact.*, 1940, **40**, 619.
[6] HUNGATE. *Bact. Rev.*, 1950, **14**, 1.
[7] SIJPENSTEIJN. Thèse. Leiden, 1948.
[8] NEALE. *J. Textil. INDSI*, 1925, **363**, 16.

IMMUNSÉRUMS ANTIHÉMOLYTIQUES

par R. LAPORTE, L. HARDRE DE LOOZE et P. ROULIER (*).

(*Institut Pasteur. Service de Sérologie.*)

On sait depuis longtemps qu'il est possible d'obtenir des immun-sérums qui inhibent l'action spécifique d'un anticorps hémolytique agissant sur des hématies en présence du complément. Qu'il s'agisse du pouvoir hémolytique que possède le sérum normal de nombreuses espèces animales vis-à-vis des hématies d'autres espèces : sérum d'anguille (Camus et Gley, Kossel), sérum de poule (J. Bordet) [1], ou du pouvoir hémolytique d'immun-sérums (J. Bordet) [2], ces auteurs montrèrent que des injections répétées, à des lapins, de ces sérums hémolytiques provenant d'animaux d'une autre espèce, provoquaient l'apparition dans le sérum des lapins d'un pouvoir neutralisant l'activité hémolytique des sérums injectés.

Ces faits expérimentaux soulevèrent pour la première fois la question de l'existence des anti-anticorps. Est-il possible d'obtenir un anticorps dont le groupement actif corresponde, en sens inverse, au groupement actif d'un autre anticorps qui se comporterait alors, envers le premier, comme un véritable antigène ? On l'a cru tout d'abord et les noms d'anti-hémolysines, d'anti-agglutinines, d'anti-précipitines furent donnés aux anti-anticorps suivant la nature de leur pouvoir neutralisant (J. Bordet, Besredka, Schütze). Mais on s'aperçut bientôt qu'en injectant, à un animal A, un immun-sérum provenant d'un animal B, d'espèce différente, on peut bien obtenir un nouvel immun-sérum qui neutralise l'action spécifique du premier sur l'antigène correspondant, mais, on aurait obtenu le même résultat si l'on avait injecté à l'animal A du sérum normal d'un animal de la même espèce que B. Autrement dit, il apparaît que l'anticorps ainsi obtenu est anti-espèce B et non pas anti-anticorps ; il peut réagir avec toutes les globulines de l'espèce B, qu'elles soient ou non des anticorps. Pfeiffer et Friedberger [3], J. Bordet [4], Dehne et Hamburger [5], Sacharoff [6], Livierato et Vagliano [7], Smith et Marrack [8], Eagle [9], Ando, Takeda et Hamamo [10].

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 4 mai 1950.

Par des expériences conduites suivant leur méthode quantitative d'immunochimie, Treffers et Heidelberger [11] conclurent, eux aussi, que la seule spécificité antigénique pouvant être mise en évidence pour les anticorps est liée à leur origine (*spécificité d'origine*) et que le groupement responsable de leur fonction anticorps n'est pas antigénique, soit parce qu'il ne représente qu'une faible partie de la molécule totale, soit pour une autre raison. Néanmoins, les mêmes auteurs [12] notèrent qu'il peut exister des différences entre les sérums anti-globulines normales de cheval et les sérums anti-globulines-anticorps de cheval ; ils proposèrent une interprétation de ce fait « en termes de polymère ».

A la suite de tous ces travaux concordant dans leur conclusion, la possibilité pour un organisme de préparer des anti-anticorps vrais doit-elle être définitivement écartée, suivant en cela l'opinion classique ? Des faits expérimentaux rapportés en 1942 par Laporte, Pérez et Hardré de Looze ne cadrèrent pas avec cette conception [13]. Des *lapins normaux*, recevant des complexes formés par les globulines réactionnelles des sérums de *lapins syphilitiques* unies avec des lipides d'organes sains, donnèrent un immunsérum précipitant le sérum d'*homme syphilitique*, mais non pas le sérum humain normal. La conclusion semblait donc en faveur de l'existence d'anti-réagine syphilitique ; l'immunsérum anti-anticorps avait été obtenu chez un animal de la même espèce que celui dont provenait l'anticorps antigénique.

Dans le présent travail nous avons repris des expériences de même ordre dans le cas particulier des immunsérums anti-hémolytiques, mais en opérant dans des conditions différentes. Deux moutons normaux ont reçu des injections intraveineuses répétées, à cinq ou six jours d'intervalle, et à doses progressivement croissantes, de sérum purifié de cheval anti-hématies de mouton ayant un titre hémolytique très élevé (40.000 unités hémolytiques par centimètre cube). Les premières injections ont été bien supportées, mais, après la sixième, on a observé un état de choc (dyspnée, abattement, jetage) durant parfois plusieurs heures après chaque injection, mais ne retentissant pas sur le bon état de santé des animaux. Dans la suite, les chocs s'atténuèrent mais ne disparurent pas complètement, surtout lorsqu'on atteignit des doses élevées (10 à 15 cm³).

Dès la fin de la troisième semaine, nous avons constaté que le sérum des animaux en expérience avait acquis la propriété d'inhiber la lyse des hématies de mouton par le sérum hémolytique de cheval associé au complément de cobaye. Nous avons pu suivre le développement de ce pouvoir antihémolytique en mesurant l'inhibition d'après la dose limite de sérum bloquant l'hémolyse provoquée par une unité de sérum hémolytique et

une quantité fixe de complément (1). Après deux mois et demi de traitement, suivi d'un repos de six semaines et d'une nouvelle injection à dose élevée, le pouvoir inhibiteur a atteint une valeur considérable, ainsi qu'on peut le constater à la lecture du tableau I.

TABLEAU I — Action du sérum inhibiteur sur l'hémolyse, par le complément, des hématies de mouton sensibilisées par du sérum hémolytique de cheval (n° 770, titre 1/25.600).

TAUX de dilution du sérum hémolytique au cheval 770	TAUX DE DILUTION DU SÉRUM INHIBITEUR										
	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1 600	1/3 200	1/6 400	1/12 800	1/25 600	1/51 200	1/102 400
1/400 . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1/800 . . .	±	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—
1/1 600 . .	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
1/3 200 . .	+	+	+	+	+	±	—	—	—	—	—
1/6 400 . .	+	+	+	+	+	+	+	±	—	—	—
1/12 800 . .	+	+	+	+	+	+	+	±	±	—	—
1/25 600 . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±

Chaque tube contient : 0,50 cm³ de sérum inhibiteur dilué; 0,50 cm³ de sérum hémolytique dilué; 0,50 cm³ de suspension d'hématies de mouton à 2 p. 100; 1 cm³ de sérum de cobaye dilué au 1/75; temps d'hémolyse : 30 minutes à 37°.

Légende : + : inhibition totale (pas d'hémolyse); ± : inhibition partielle (hémolyse partielle); — : pas d'inhibition (hémolyse totale)

Quelle est la cause de l'inhibition de l'hémolyse ? On sait que la lyse des hématies par un sérum hémolytique spécifique ne se produit que si une quantité suffisante de complément se fixe sur les globules sensibilisés par l'hémolysine contenue dans le sérum. Donc l'absence d'hémolyse dans les tubes où nous ajoutons le sérum inhibiteur peut être due soit à une action directe sur l'hémolysine, soit simplement à la disparition du complément. Or, le complément peut disparaître par fixation sur un complexe antigène-anticorps autre que celui qui est constitué par les hématies sensibilisées, ou bien encore par une action anti-complémentaire non spécifique exercée par le sérum inhibiteur.

Deux ordres de complexes antigène-anticorps, présents dans les tubes, auraient pu, en effet, fixer le complément : ceux formés

(1) La dose de sérum inhibiteur nécessaire et suffisante pour neutraliser exactement une dose fixe de sérum hémolytique varie suivant la dose de complément. Cela ne peut surprendre, puisque l'on sait que l'activité d'une quantité fixe d'hémolysine varie aussi avec la dose de complément utilisée.

par le sérum des moutons ayant reçu des injections de sérum hémolytique de cheval (ce sérum précipitant le sérum de cheval, normal ou hémolytique) et ceux dus aux anticorps anti-protéines de mouton qui sont contenus dans le sérum hémolytique de cheval. Or nous avons vérifié que l'addition de sérum normal de mouton dans les tubes contenant du sérum hémolytique de cheval, du complément de cobaye et des hématies de mouton, n'avait pas d'effet inhibiteur [en dehors d'une action anti-complémentaire non spécifique, exercée par certains sérums employés purs, et qui disparaît dès qu'ils sont dilués] (2). Ce n'est donc pas l'action fixatrice exercée par des complexes formés par les anticorps anti-protéines de mouton du sérum hémolytique qui peut expliquer le pouvoir inhibiteur acquis par le sérum de nos moutons.

En est-il de même pour les complexes formés par les anticorps anti-sérum de cheval contenus dans le sérum inhibiteur ? Pour le savoir, nous avons effectué des injections intraveineuses répétées, à doses croissantes, de sérum normal de cheval à un mouton neuf jusqu'à ce que son sérum ait acquis un pouvoir précipitant très net pour le sérum de cheval. Ce sérum contenait donc des anticorps anti-sérum de cheval, mais nous avons constaté qu'il n'avait pas acquis, de ce fait, un pouvoir inhibiteur de l'hémolyse, sauf lorsqu'on l'employait pur, ce qui était dû à une simple action anti-complémentaire non spécifique. Les conclusions que nous pouvions tirer de cette expérience, ont été rendues encore plus démonstratives par l'épreuve suivante. Nous avons fait agir le sérum inhibiteur sur un système hémolytique formé par du sérum de *lapin* anti-hématies de mouton, du complément de cobaye et des hématies de mouton. L'action inhibitrice du sérum de nos moutons s'est exercée aussi nettement. L'épreuve a été faite avec 12 sérums hémolytiques de lapin, de titre différent ; l'inhibition a paru d'autant plus marquée que le titre de ces sérums était plus élevé ; avec un sérum très actif, elle est considérable [voir tableau II] (3).

Il est donc bien évident que ce n'est pas à une fixation sur un système anti-cheval qu'est lié le phénomène de blocage, pas plus qu'à l'action neutralisante d'un anticorps anti-globuline de cheval, anticorps non spécifique de la fonction hémolytique, puisque l'inhibition s'exerce aussi lorsqu'on remplace le sérum hémolytique de cheval par du sérum hémolytique de lapin.

(2) On sait que les systèmes antigène-anticorps constitués par des protéines et les anticorps correspondants n'ont parfois qu'une activité fixatrice du complément très légère ou nulle.

(3) Nous nous sommes, bien entendu, assurés que le sérum normal de mouton n'inhibe pas plus le système hémolytique lapin-anti-mouton que le système cheval-anti-mouton.

TABEAU II. — Action du sérum inhibiteur sur l'hémolyse, par le complément, des hématies de mouton sensibilisées par du sérum hémolytique de lapin.

TAUX de dilution du sérum hémolytique de lapin	TAUX DE DILUTION DU SÉRUM INHIBITEUR							
	1/53	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1.600	1/3.200	1/6.400
1/400	+	±	—	—	—	—	—	—
1/800	+	+	±	—	—	—	—	—
1/1.600	+	+	+	±	—	—	—	—
1/3.200	+	+	+	+	+	±	—	—
1/6.400	+	+	+	+	+	+	±	—
1/12 800 . . .	+	+	+	+	+	+	+	±

Chaque tube contient : 0,50 cm³ de sérum inhibiteur dilué; 0,50 cm³ de sérum hémolytique dilué; 0,50 cm³ de suspension d'hématies de mouton à 2 p. 100; 1 cm³ de complément au 1/45.

Une objection pouvait néanmoins être faite. L'action de l'anticorps neutralisant ne s'exercerait-elle pas sur les globulines hémolytiques de lapin grâce à une communauté d'antigène entre les globulines de lapin et celles de cheval ? Pour répondre à cette objection et rechercher en même temps si le sérum inhibiteur n'exerce pas simplement une action anti-complémentaire non spécifique, nous avons réalisé l'expérience suivante : des lapins ont reçu des injections répétées de globules rouges de bœuf, par voie veineuse, afin d'obtenir un sérum hémolytique anti-bœuf. Avant d'être utilisé pour ces recherches, ce sérum a été préalablement absorbé par des hématies de mouton pour éliminer les hémolysines actives à la fois sur les hématies de bœuf et celles de mouton. Après absorption, il conservait un pouvoir hémolytique considérable pour les hématies de bœuf seulement. Nous avons alors constaté que l'addition du sérum de nos moutons dans des tubes contenant un système hémolytique constitué par ce sérum spécifique des hématies de bœuf, du complément de cobaye et des globules de bœuf, ne provoquait aucune inhibition de l'hémolyse. C'est la preuve que cette inhibition, qui s'exerce seulement sur un système hémolytique anti-mouton, n'est pas due à un pouvoir anti-complémentaire non spécifique ni à la présence d'anticorps anti-protéines de lapin. Une seule explication demeure, l'effet de blocage est lié à une action portant directement sur les hémolysines anti-mouton, indépendamment de l'espèce ayant formé ces hémolysines.

Nous avons pu constater combien était spécifique cette action inhibitrice développée contre les anticorps hémolytiques ayant

servi à préparer nos moutons. On sait que les sérums hémolytiques, obtenus par des injections de globules rouges de mouton à des lapins ou à des chevaux, contiennent tous des hémolysines actives à la fois sur des hématies de mouton et de bœuf ainsi que des hémolysines qui ne lysent que des hématies de mouton et sont sans action sur des hématies de bœuf. Les hémolysines communes mouton-bœuf ayant été injectées en même temps que les hémolysines spécifiques des seules hématies de mouton, les moutons traités ont développé des anticorps bloquant les hémolysines des deux types. On peut voir sur le tableau IV combien est net l'effet de blocage du sérum inhibiteur sur la lyse d'hématies de bœuf par un sérum hémolytique de

TABEAU III. — Action du sérum inhibiteur, sur l'hémolyse, par le complément des hématies de bœuf sensibilisées par du sérum hémolytique de lapin anti-bœuf (absorbé par des hématies de mouton; titre 1 500).

DILUTIONS du sérum de lapin anti-bœuf	DILUTIONS DU SÉRUM INHIBITEUR					
	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800
1/50	—	—	—	—	—	—
1/100	—	—	—	—	—	—
1/200	—	—	—	—	—	—
1/400	±	—	—	—	—	—

Chaque tube contient : 0,50 cm³ de sérum inhibiteur dilué; 0,50 cm³ de sérum hémolytique dilué; 0,50 cm³ de suspension d'hématies de bœuf à 2 p. 100; 1 cm³ de complément au 1/30.

TABEAU IV. — Action du sérum inhibiteur sur l'hémolyse, par le complément, des hématies de bœuf sensibilisées par du sérum hémolytique de la in anti-mouton (titre 1/500 pour les hématies de bœuf).

DILUTION du sérum de lapin anti-mouton	DILUTIONS DU SÉRUM INHIBITEUR					
	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800
1/50	+	±	—	—	—	—
1/100	+	+	+	±	—	—
1/200	+	+	+	+	±	—
1/400	+	+	+	+	+	±

Chaque tube contient : 0,50 cm³ de sérum inhibiteur dilué; 0,50 cm³ de sérum hémolytique dilué; 0,50 cm³ de suspension d'hématies de bœuf à 2 p. 100; 1 cm³ de complément au 1/30.

lapin anti-mouton, en présence de complément de cobaye. Ce phénomène contraste étrangement avec l'absence d'inhibition de la lyse des globules de même espèce par un sérum de lapin ne contenant que des hémolysines spécifiques des hématies de bœuf (expérience précédente).

Toutes ces expériences prouvent que le phénomène d'inhibition de l'hémolyse que nous étudions n'est pas dû à la disparition du complément par fixation interférente ou par action anti-complémentaire non spécifique. Il est possible de démontrer, d'une façon encore plus nette, que les globules de mouton sensibilisés par l'hémolysine correspondante et traités par une dose convenable de sérum inhibiteur deviennent insensibles à l'action du complément. L'expérience consiste à déterminer, dans un premier temps, la dose de sérum inhibiteur juste suffisante pour empêcher la lyse d'hématies de mouton sensibilisées par une dose connue d'hémolysine et soumises à l'action d'une dose élevée de complément. Un tube contenant ce système hémolytique totalement bloqué, sans excès de sérum inhibiteur, est placé au bain-marie à 37° en même temps qu'un tube témoin contenant des doses égales de tous les réactifs, mais ne contenant pas de sérum inhibiteur. Quand l'hémolyse est totale dans le tube témoin on sépare les globules, par centrifugation, dans le tube où l'inhibition s'est produite. On procède alors au titrage du complément résiduel contenu dans le liquide décanté, en utilisant des hématies de bœuf sensibilisées par l'hémolysine spécifique d'un sérum anti-bœuf. Dans ces conditions, on constate qu'il persiste du complément libre dans ce liquide et, si la dose initiale a été convenablement choisie, ce complément résiduel peut être plusieurs fois suffisant pour lyser totalement la dose de globules dont l'hémolyse avait été bloquée au premier temps de l'expérience. Il est intéressant de signaler que ce titrage du complément résiduel peut être aussi effectué par des globules de mouton sensibilisés, car la substance inhibitrice se fixe dans le premier temps sur les globules sensibilisés et est éliminée du mélange avec eux. Cette élimination est totale si la dose du sérum inhibiteur a bien été choisie pour neutraliser exactement et sans excès la dose de sérum hémolytique utilisée.

Précisons enfin que cette substance inhibitrice est presque totalement séparée du sérum de nos moutons par précipitation par le sulfate d'ammonium à 33 p. 100 de saturation. Un dernier caractère est que, si elle se fixe sur les globules sensibilisés par l'hémolysine, elle n'empêche pas, de ce fait, la fixation du complément sur ces globules ; mais cette absorption du complément n'entraîne pas la lyse, à l'inverse de ce qui se produit lorsque la substance inhibitrice est absente.

Donc, en résumé, le pouvoir anti-hémolytique, développé chez nos moutons par des injections répétées de sérum hémolytique très actif de cheval anti-mouton, n'est pas dû :

1° A une fixation du complément sur un complexe anti-protéine de cheval ou à une action neutralisante sur la globuline de cheval qui constitue l'hémolysine, action indépendante de la fonction hémolytique de cette globuline, puisque le blocage s'exerce aussi sur un sérum hémolytique de *lapin* anti-mouton.

2° A une action anti-complémentaire non spécifique, puisque la lyse des globules de bœuf par un sérum hémolytique de *lapin* anti-bœuf n'est pas entravée.

3° A toute autre cause pouvant fixer ou détruire le complément, puisque l'inhibition de l'hémolyse peut s'exercer en présence d'un excès de complément laissant une quantité de complément résiduel qui aurait largement suffi pour lyser les hématies, si la substance inhibitrice n'avait pas été présente.

Sans préjuger en rien de la possibilité d'obtenir des anticorps dans d'autres cas que celui que nous avons étudié et qui concerne la réaction d'un animal contre des anticorps lytiques pour ses propres cellules sanguines, on ne voit pas comment les résultats que nous avons obtenus pourraient être expliqués si l'on n'admet pas la faculté pour un organisme de préparer, au moins dans certains cas particuliers, des anticorps adaptés aux groupements actifs d'autres anticorps. Nous pensons avoir démontré que seule cette faculté peut expliquer la formation des anti-hémolysines sériques obtenues par immunisation (4).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. BORDET. *Ces Annales*, 1899, **13**, 273.
- [2] J. BORDET. *Ces Annales*, 1900, **14**, 257.
- [3] PFEIFFER et FRIEDBERGER. *Berl. Klin. Wochenschr.*, 1902, n° 1 ; *Centralbl. Bakt., Orig.*, 1903, **34**, 70.
- [4] J. BORDET. *Ces Annales*, 1904, **18**, 593.
- [5] DEHNE et HAMBURGER. *Wein. Klin. Wochenschr.*, 1904, **17**, 807.
- [6] SACHAROFF. *Centralbl. Bakt., Orig.*, 1905, **39**, 99.
- [7] LIVIERATO et VAGLIANO. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, 1067.
- [8] SMITH et MARRACK. *Brit. J. exp. Path.*, 1930, **11**, 494.
- [9] EAGLE. *J. Immunol.*, 1935, **29**, 41.

(4) Il n'est pas sans intérêt de rapprocher les anticorps anti-hémolytiques que nous avons obtenus des anti-enzymes dont l'existence est bien démontrée. Parmi tous les anticorps, les hémolysines semblent, en effet, être ceux dont le mode d'action ressemble le plus à celui des ferments. Les expériences récentes de Mayer, Croft et Gray [14] ont mis clairement en évidence l'action pseudo-enzymatique des hémolysines sériques.

- [10] ANDO, TAKEDA et HAMANO. *J. Immunol.*, 1938, **34**, 303.
- [11] TREFFERS et HEIDELBERGER. *J. exp. Med.*, 1941, **73**, 125 et 293.
- [12] TREFFERS, MOORE et HEIDELBERGER. *J. exp. Med.*, 1942, **75**, 135.
- [13] LAPORTE, PÉREZ et HARDRÉ DE LOOZE. *Ces Annales*, 1946, **72**, 678.
- [14] MAYER, CROFT et GRAY. *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 427.

LA TECHNIQUE DE CULTURE CONTINUE

THÉORIE ET APPLICATIONS

par JACQUES MONOD.

(Institut Pasteur.
Service de Physiologie microbienne.)

I. — INTRODUCTION.

Repiquer une culture bactérienne, c'est, dans l'acception courante, diluer un petit volume de culture dans un grand volume de milieu neuf. Cette opération introduit dans la croissance une discontinuité et dans l'expérience un élément d'incertitude que connaissent bien les bactériologistes. Discontinuité et incertitude seront d'autant moindres que les repiquages seront plus fréquents et pratiqués à dilution moins grande. A la limite on aurait une culture maintenue par dilution continue calculée de façon que la croissance des germes soit exactement compensée. Une culture ainsi entretenue croîtrait indéfiniment, à vitesse constante, dans des conditions constantes. La discontinuité aurait disparu ainsi que l'élément d'incertitude qu'elle comporte. Il est évident que par la constance des conditions de milieu, du taux de croissance, donc de l'état physiologique des germes, une telle culture serait un objet d'expérience extrêmement favorable.

Les recherches poursuivies dans ce laboratoire nous ont amenés à mettre ce principe en œuvre (Monod, Torriani et Doudoroff, 1950) [2] et à étudier les propriétés des cultures continues. On verra par ce qui suit, je l'espère, que l'intérêt de cette technique ne se borne pas à l'obtention de cultures permanentes et stables. Les cultures continues constituent, dans certaines conditions, des systèmes en équilibre, de sorte que l'étude d'un phénomène en fonction du temps peut y être souvent remplacée par sa mesure à l'état d'équilibre, ce qui présente de grands avantages, théoriques autant que pratiques.

J'essaierai ici d'exposer les propriétés générales de ces systèmes continus, et d'indiquer les moyens de les utiliser dans différents types d'expériences. Ce n'est là qu'une première approximation. Le problème mériterait d'être traité, du point de vue théorique, d'une façon plus rigoureuse et plus approfondie que je ne saurais

à faire. Quant à la réalisation technique, on ne trouvera ici que la description d'un montage assez primitif, dont le seul mérite est la simplicité.

II. — THÉORIE.

A. CROISSANCE EXPONENTIELLE CONTINUE. CONDITIONS D'ÉQUILIBRE. — Considérons un récipient B contenant un volume donné V_B de culture bactérienne. Supposons que, les conditions de milieu étant favorables, cette culture se développe à taux constant. Supposons que du milieu neuf, en réserve dans une nourriture N, soit amené de façon continue dans le récipient B par une tubulure ad hoc (T_1), tandis que, grâce à un artifice quelconque, une quantité égale de milieu est retirée à chaque instant par une seconde tubulure (T_2) aboutissant à un second récipient (P). Supposons que les bactéries tombant dans le récipient P cessent immédiatement de se multiplier (soit qu'elles soient congelées, soit que le récipient P contienne une substance antiseptique ou bactériostatique). Supposons enfin qu'en dépit du milieu neuf constamment admis dans la culture, l'homogénéité de la suspension bactérienne et des substances nutritives dissoutes soit

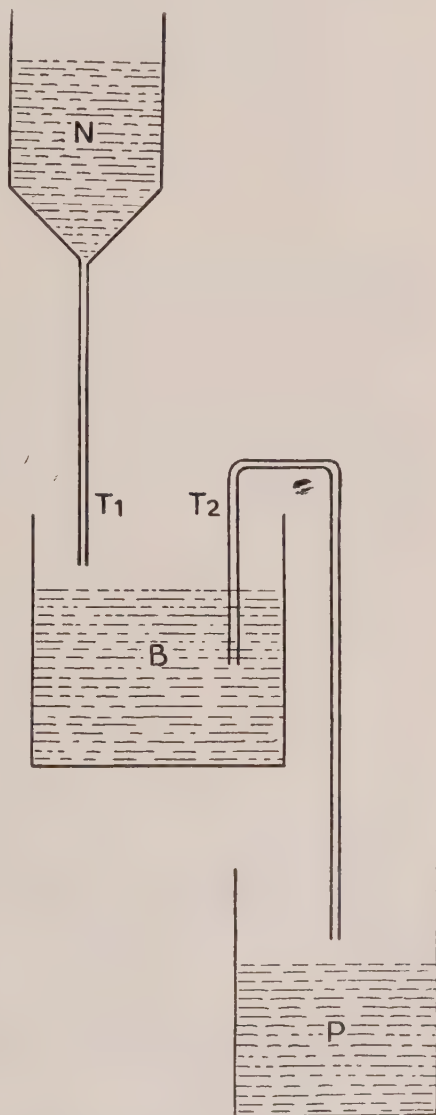


FIG. 1. — Schéma d'un appareil à culture continue.

assurée par un brassage efficace du liquide dans le récipient B. Ce brassage est supposé assurer également l'équilibre

entre le milieu liquide et l'atmosphère gazeuse du récipient.

Soit : x_B la masse bactérienne contenue dans le récipient B ;

x_P la masse bactérienne contenue dans le récipient P ;

x_B la masse bactérienne totale.

On a par définition :

$$x_B = x_T - x_P$$

et en dérivant par rapport au temps :

$$\frac{dx_B}{dt} = \frac{dx_T}{dt} - \frac{dx_P}{dt} \quad (1)$$

Etant donné que seules les bactéries contenues dans B se multiplient, on voit que :

$$\frac{dx_T}{dt} = \mu x_B \quad (2)$$

μ est une constante que nous appellerons « taux de croissance népérien » (1). L'accroissement de la masse bactérienne en P est à chaque instant proportionnel à x_B et au débit du système. Si nous définissons ce débit (D) comme le rapport du volume débité par unité de temps, au volume V_B , nous pourrions écrire :

$$\frac{dx_P}{dt} = D \cdot x_B \quad (3)$$

En combinant (1), (2) et (3) on obtient :

$$\frac{dx_B}{dt} = (\mu - D) x_B \quad (4)$$

et en intégrant :

$$\text{Log}_e \frac{x_B}{x_0} = (\mu - D) t \quad (5)$$

x_0 est ici une constante exprimant la masse bactérienne au temps $t = 0$.

Si nous considérons un intervalle de temps quelconque, $t_2 - t_1$, et l'accroissement correspondant, $x_2 - x_1$, de la masse bactérienne dans B, nous pouvons écrire :

$$\frac{\text{Log}_e x_2 - \text{Log}_e x_1}{t_2 - t_1} + D = \mu \quad (5 \text{ bis})$$

Cette équation permet de calculer le taux de croissance, connaissant l'accroissement de la culture et le taux de dilution.

(1) Le taux de croissance est généralement défini comme le nombre de divisions (ou de doublements de la masse) par unité de temps. On passe du « taux de croissance népérien » (μ) au taux de croissance usuel (μ_2) en divisant par $\text{Log}_e 2$:

$$\mu_2 = \frac{\mu}{0,69}$$

Le système est en équilibre lorsque $\mu = D$. Dans cette condition, la masse bactérienne ou, ce qui revient au même, la densité de la culture en B est constante, tandis que le « produit » s'accumule en P proportionnellement au temps.

Si l'on dispose d'un moyen de régler le débit, il est donc possible, en principe, de maintenir indéfiniment la culture à toute densité compatible avec la croissance au taux maximum, tandis que la multiplication se poursuit au taux correspondant à la phase exponentielle.

B. CROISSANCE CONTINUE A TAUX LIMITÉ. — La croissance d'une culture dans un milieu non renouvelé modifie la composition de ce milieu et crée ainsi des conditions qui ralentiront et, en définitive, arrêteront la croissance. Dans le milieu constamment renouvelé du récipient « B », ceci ne se produira pas si le taux de dilution équilibre *exactement* le taux de croissance maximum. Pour peu que le taux de dilution soit *inférieur* au taux de croissance, il en ira autrement. La densité de la culture dans B s'accroîtra à un taux « apparent » égal à $\mu - D$, tant que les conditions de milieu demeureront optimales. Tôt ou tard l'apport de milieu neuf ne suffira plus à maintenir ces conditions pour une population accrue, de sorte que le taux de croissance diminuera. Il est clair qu'il atteindra ainsi, nécessairement, la valeur d'équilibre ($\mu = D$), mais qu'il ne tombera pas sensiblement *au-dessous* de cette valeur, car alors la population diminuerait et l'apport désormais en excès de milieu neuf tendrait à restituer les conditions primitives, par conséquent à augmenter le taux de croissance. *Celui-ci s'ajustera donc automatiquement à la valeur d'équilibre et y demeurera indéfiniment.*

Ces conditions de fonctionnement pour lesquelles le système tend vers un équilibre stable sont particulièrement intéressantes et nous allons chercher à les définir d'une façon plus rigoureuse.

Considérons une culture se développant dans un milieu de composition définie, et telle que le seul « facteur limitant » de la croissance soit la concentration de l'un des aliments essentiels, par exemple l'aliment carboné. On sait (Cf. Monod, 1942-1949) [1] que dans un tel milieu (non renouvelé) la croissance totale (2) est proportionnelle à la concentration initiale de l'aliment carboné. On sait aussi que le taux de croissance varie avec la concentration de l'aliment carboné suivant une loi assez bien exprimée par la relation hyperbolique :

$$\mu = \mu_0 \frac{S}{S_K + S} \quad (6)$$

(2) Différence entre la densité initiale et la densité maximum. La densité de la culture est définie comme le poids sec de substance bactérienne par unité de volume.

dans laquelle μ est le taux de croissance correspondant à une concentration S d'aliment limitant, μ_0 le taux de croissance maximum, qui prévaut quand S est grand, S_K , une constante caractéristique de l'organisme et de la substance considérée.

On sait enfin que, dans la plupart des cas connus, la valeur de la constante d'« affinité » S_K est très petite par rapport aux valeurs de la concentration S permettant un développement assez abondant des cultures. Ceci revient à dire que le taux de croissance est, en pratique, indépendant de la concentration de l'aliment carboné, sauf lorsque celle-ci est excessivement faible.

Considérons maintenant une culture se développant dans le récipient B (fig. 1) alimenté par une nourrice contenant un milieu de composition telle que la concentration de l'aliment carboné constitue le seul facteur limitant de la croissance. Soit S_0 la concentration de l'aliment limitant dans le milieu neuf ; S , la concentration de cet aliment dans B ; R , la constante de rendement (Cf. Monod, *loc. cit.*). On peut écrire :

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{1}{R} \frac{dx_T}{dt} \quad (7)$$

En effet : 1° la concentration S de l'aliment dans B tend à se rapprocher de la concentration S_0 dans le milieu neuf d'autant plus vite que la différence de ces concentrations est plus grande et le débit plus rapide ; 2° la concentration S tend à diminuer d'autant plus vite que l'accroissement de la masse bactérienne totale est plus rapide. Ce second terme

$$\left(- \frac{1}{R} \frac{dx_T}{dt} \right)$$

exprime l'hypothèse que le rendement de la croissance est constant, indépendamment de son taux (3). En remplaçant

$$\frac{dx_T}{dt}$$

dans l'équation (7) par sa valeur tirée de l'équation (2), on obtient :

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{x_R}{R} \mu$$

et en remplaçant μ par sa valeur, donnée par (6) :

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{x_R}{R} \mu_0 \frac{S}{S_K + S} \quad (8)$$

(3) Voir à ce sujet Monod (1942) [1], Teissier (1942) [3] et plus loin, p. 398.

Une culture ne peut être dite à l'équilibre que si S et x_B sont constants, c'est-à-dire lorsque l'on a à la fois :

$$\frac{dS}{dt} = 0$$

et

$$\frac{dx_B}{dt} = 0.$$

D'après les équations (4), (6) et (8), ces deux conditions peuvent s'écrire respectivement :

$$D(S_0 - S) = \frac{\mu_B}{R} \mu_0 \frac{S}{S_K + S} \quad (9)$$

et

$$\nu_0 \frac{S}{S_K + S} = D. \quad (10)$$

Il est évident que l'équilibre n'est pas réalisable si $D > \mu_0$ puisque l'équation (10) ne serait vérifiée pour aucune valeur de S ou de D . En revanche, un équilibre stable est nécessairement atteint si $D < \mu_0$. En effet si, à un moment quelconque x_B est inférieur à la valeur satisfaisant l'équation (9), alors

$$\frac{dS}{dt}$$

est positif, S s'accroît, de sorte que

$$\mu_0 \frac{S}{S_K + S} - D$$

prend une valeur positive, et la culture s'accroît. L'inverse se produit si x_B est supérieur à la valeur d'équilibre. De même, si S est plus grand que la valeur satisfaisant l'équation (10), alors

$$\frac{dx_B}{dt}$$

est positif [équation (4)], la culture croît, de sorte que l'égalité (9) n'est plus satisfaite, et

$$\frac{dS}{dt}$$

devient négatif. L'inverse se produit si S est inférieur à la valeur satisfaisant l'équation (10). Si, l'équilibre étant atteint, on modifie le débit (tout en le maintenant inférieur à μ_0), le système évolue, pour les mêmes raisons, vers un nouvel équilibre ; la densité bactérienne et la concentration de l'aliment limitant se stabilisent à de nouvelles valeurs, telles que le taux de croissance soit de nouveau égal au taux de dilution. *L'expérimentateur dispose*

donc là d'un moyen de modifier à son gré le taux de croissance et de le régler à une valeur quelconque inférieure à μ_0 .

On voit, d'après (10), qu'à l'équilibre l'équation (9) se simplifie en :

$$x_B = R (S_0 - S). \quad (9 \text{ bis})$$

De plus, comme l'équilibre stable exige

$$D = \mu_0 \frac{S}{S_K + S} < \mu_0.$$

comme, d'autre part, la valeur de la fraction

$$\frac{S}{S_K + S}$$

est pratiquement indépendante de S tant que S est d'un ordre de grandeur supérieur à S_K ; comme enfin les valeurs expérimentalement déterminées (v. ci-dessus) de S_K sont très petites, l'équilibre ne sera atteint que pour de faibles valeurs de S .

Cette remarque est importante car, en pratique, les valeurs choisies pour la concentration initiale, S_0 , seront presque invariablement beaucoup plus grandes que les valeurs d'équilibre de S . A l'équilibre $S_0 - S$ sera donc très peu différent de S_0 , et l'équation (9 bis) se simplifiera encore en :

$$x_B = RS_0.$$

Autrement dit, tout se passera comme si, malgré la dilution continue du milieu, l'aliment limitant était entièrement consommé par les bactéries. Eclairons cette conclusion d'un exemple. Pour *E. coli* se développant en milieu défini, avec du glucose comme aliment limitant, la constante S_0 est de l'ordre de 10^{-5} (Monod, 1942). Or, la concentration de glucose qui donnerait une « bonne culture » aux yeux d'un bactériologiste serait de 10^{-3} à 5×10^{-3} , soit 100 à 500 fois plus grande. Avec $D = 0,5 \mu_0$ l'équation (10) s'écrirait :

$$0,5\mu_0 = \mu_0 \frac{S}{10^{-5} + S}$$

d'où $S = 10^{-5}$. L'équation (9 bis) nous donnerait alors, avec $S_0 = 2 \times 10^{-3}$,

$$x_B = R (2.10^{-3} - 10^{-5})$$

et l'on voit que x_B ne différerait que de 1/200 de la valeur maximum correspondant à l'utilisation intégrale de l'aliment carboné. Avec $D = 0,9 \mu_0$, la densité de la culture, à l'équilibre, ne serait inférieure que de 5 p. 100 à la valeur maximum.

Il apparaît donc que dans ces conditions, non seulement le système est auto-régulateur, mais encore le taux de croissance

peut être fixé à toute valeur voulue (inférieure à $0,9 \mu_0$ environ) et modifié en cours même d'expérience, sans que cependant la densité de la culture subisse de variations appréciables. Ce sont surtout ces propriétés singulières du « régime auto-régulateur » qui font l'intérêt des cultures continues ; dans les paragraphes qui suivent on verra comment ces propriétés peuvent être mises à profit pour l'étude de quelques problèmes-types de physiologie microbienne.

C. APPLICATIONS A QUELQUES PROBLÈMES DE PHYSIOLOGIE MICROBIENNE. — *Relation entre le taux de croissance et la concentration d'un aliment limitant.* — L'étude de cette relation constitue évidemment l'une des applications les plus immédiates de la technique de culture continue. Lorsque pour une telle étude on utilise des cultures en milieu non renouvelé, on rencontre de graves difficultés qui tiennent aux faibles valeurs des constantes d'affinité : dans la plupart des cas, les concentrations d'aliment limitant donnant des cultures visibles se trouvent dans la zone de saturation. Le problème consiste donc à maintenir la concentration de l'aliment limitant à des valeurs constantes et très faibles. Or, c'est là le résultat obtenu automatiquement avec une culture continue lorsque le débit est inférieur au taux de croissance maximum, c'est-à-dire en régime autorégulateur.

Il n'est pas nécessaire d'insister sur le fait évident que l'emploi de cette technique n'est justifié que si la constitution du milieu est telle que l'aliment étudié constitue bien le *seul* facteur limitant de la croissance (*Cf.* à ce sujet, Monod, 1942, p. 33). Ceci posé, il n'est en revanche nullement nécessaire que la forme générale de la relation soit connue. Il faut et il suffit qu'un équilibre *stable* soit atteint pour qu'on puisse écrire :

$$\mu = D = f(S).$$

Or, un équilibre stable ne peut manquer d'être atteint, pour peu que la relation présente la forme générale d'une courbe de saturation, ce qui, *a priori*, semble devoir être toujours le cas. Le dosage direct de l'aliment limitant, dans le liquide de la culture, permet alors d'établir la forme de la relation $\mu = f(S)$.

Il n'est pas non plus nécessaire, pour que la technique soit applicable, que les variations de x_B (densité de la culture) avec le taux de dilution soient négligeables. En fait, la seule limite à l'application de cette technique sera la précision du dosage chimique. On pourrait, en principe, éviter le dosage direct de S , en déduisant sa valeur de la relation (9 bis) :

$$x_B = R(S_0 - S).$$

Mais comme les variations de x_B à différents équilibres seront

toujours faibles (ou même insensibles), les erreurs seraient considérables. En outre, comme nous allons le voir, la relation (9 bis) représente une approximation qui pourrait être en défaut dans certains cas.

Rendement de la croissance. — En effet, considérer l'équation (9 bis) comme exacte, revient à admettre l'hypothèse [exprimée par le second terme de l'équation (7)] que le rendement de la croissance est indépendant du taux de croissance. Lorsque cette hypothèse est acceptable, l'équation (9 bis) permet de déterminer la constante de rendement R. Le dosage de l'aliment limitant à l'équilibre est inutile. En principe, il suffit de déterminer x_B pour deux ou plusieurs valeurs de S_0 . Ce n'est pas là une application particulièrement intéressante de la méthode puisque, dans la mesure même où l'hypothèse d'indépendance est exacte, on peut utiliser tout aussi bien les techniques habituelles. On sait que cette hypothèse se vérifie avec précision lorsque la croissance est limitée par l'épuisement de l'aliment carboné (Cf. Monod, *loc. cit.*). Il est probable qu'elle représente une bonne approximation dans la plupart des cas, mais qu'elle cesse d'être exacte au delà de certaines limites, ou pour certains aliments. Par exemple, toute dépense nutritive affectée d'un « coefficient d'entretien » appréciable ne saurait être indépendante du taux de croissance. Si l'on manque de données à cet égard, c'est en partie parce qu'on ne disposait pas d'une technique adéquate. Les « cultures continues » dont on peut faire varier le taux de croissance sans pour cela modifier ni la température, ni la composition du milieu (si ce n'est la concentration d'un aliment) apportent une solution à ce problème expérimental. Si nous admettons que le rendement, R, est une fonction, $\varphi(\mu)$, du taux de croissance, l'équation (9 bis) devient :

$$\frac{x_B}{S_0 - S} = \varphi(\mu) = \varphi(D). \quad (9 \text{ ter})$$

La détermination de S et de x_B pour différentes vitesses de dilution permet d'établir la forme de la relation entre le taux de croissance et le rendement.

Cependant, il ne faudrait pas l'oublier, cette méthode n'est justifiée que si le rendement est indépendant de la *concentration* de l'aliment. C'est là une seconde « hypothèse d'indépendance » qui pourrait se trouver en défaut lorsque la concentration de l'aliment varie beaucoup, ou lorsqu'elle devient très petite, ce qui est précisément le cas pour l'aliment limitant à l'équilibre. On conçoit, en effet, qu'une substance métabolisée par deux systèmes enzymatiques distincts avec des constantes d'affinités assez différentes pourrait ne pas donner les mêmes rendements à forte et à faible concentration. La solution de cette difficulté consiste à

composer le milieu de façon que le facteur limitant soit une source alimentaire *autre que celle dont on veut déterminer le rendement*. L'équation (7), donc l'équation (9^{ter}), n'en reste pas moins valable pour cela. Il faut encore cependant que la concentration S_0 de l'aliment étudié ne soit pas choisie trop grande afin que $S_0 - S$ soit mesurable avec précision, ni trop petite, de façon que S reste assez grand pour que ses variations puissent être considérées comme sans effet.

Les variations du rendement en fonction de la concentration d'un aliment peuvent avoir, dans certains cas, un intérêt propre. Ici encore l'artifice qui consiste à limiter le taux de croissance par un aliment autre que celui dont on étudie le rendement est applicable. D étant maintenu constant, on déterminerait S par dosages, pour différentes valeurs de S_0 .

On sait enfin que le rendement de la croissance bactérienne est fonction de la température (Cf. Monod, 1942, p. 106). Mais il n'est pas possible, par les techniques usuelles, d'étudier cet effet indépendamment des variations concomitantes du taux de croissance. La culture continue à taux limité permet d'atteindre ce résultat dans certaines conditions. Supposons que, par réglage du débit, le taux de croissance d'une culture soit fixé à une valeur légèrement inférieure au taux maximum correspondant à une température donnée. Supposons que cette température soit assez loin de l'optimum. Cette culture peut être portée à toute température pour laquelle le taux maximum est supérieur au débit fixé, sans que soit modifié le taux de croissance. Il est évident, cependant, que l'accroissement de la température se traduira, dans de telles conditions, par une variation (en général une diminution) de la concentration d'équilibre de l'aliment limitant. On devra donc éventuellement tenir compte de l'effet de dilution discuté dans les paragraphes précédents, et l'éviter en faisant en sorte que l'aliment limitant ne soit pas celui dont on cherche à déterminer le rendement en fonction de la température.

La possibilité de dissocier, dans une certaine mesure, deux phénomènes physiologiques, tous deux fonction de la température, constitue sans doute l'une des applications les plus intéressantes de la méthode. Nous y reviendrons tout à l'heure.

Vitesses de synthèses. — L'étude de la cinétique d'un processus de synthèse spécifique, tel que la formation d'un enzyme ou autre constituant cellulaire, comporte de graves difficultés, et de toutes sortes, la plupart inhérentes au phénomène lui-même. Certaines de ces difficultés cependant tiennent aux techniques de culture. Les suspensions dites « non proliférantes » ne peuvent être employées s'il s'agit d'un phénomène lié, fût-ce indirectement, à la croissance. D'ailleurs, les propriétés de ces suspensions qui contiennent un nombre variable, généralement indéterminé, de germes

non viables, se modifient rapidement avec le temps. Une culture en voie de croissance ne peut être considérée comme physiologiquement stable qu'au cours de la phase exponentielle, souvent trop courte pour les besoins de l'expérience. Encore la composition du milieu se modifie-t-elle très rapidement au cours de cette phase. Enfin, la variation continue de la densité bactérienne au cours de l'expérience introduit une difficulté supplémentaire. L'emploi de cultures continues que l'on peut maintenir indéfiniment dans un milieu constant, à taux de croissance constant, à densité constante, est donc tout indiqué.

Les cultures continues présentent pour ce type d'expériences d'autres avantages remarquables. En premier lieu, mesurer le taux d'une réaction de synthèse dans une culture continue revient à déterminer un état d'équilibre, au lieu de mesurer à intervalles successifs l'accumulation d'une substance. En second lieu, le contrôle du taux de croissance permet d'étudier le degré de dépendance (ou d'indépendance) de la réaction de synthèse considérée, à l'égard des processus de synthèse dans leur ensemble. Il permet en somme de distinguer, dans une certaine mesure, les effets d'un agent actif à la fois sur le phénomène envisagé et sur d'autres qui pourraient le masquer. Afin de préciser les propriétés de ces systèmes, nous allons considérer maintenant quelques modèles théoriques de réactions de synthèse.

Supposons une culture continue, en train de se multiplier dans les conditions du régime auto-régulateur. Supposons un constituant cellulaire Z, un enzyme par exemple, synthétisé par les bactéries en train de proliférer. Soit Z_B la quantité de Z dans le récipient B, Z_P la quantité de Z dans le récipient P, Z_T la quantité totale.

On peut écrire :

$$\frac{dZ_B}{dt} = \frac{dZ_T}{dt} - \frac{dZ_P}{dt} \quad (11)$$

l'accroissement de Z dans le récipient P est donné par :

$$\frac{dZ_P}{dt} = Z_B D \quad (12)$$

D représentant, comme ci-dessus, la vitesse de dilution.

Pour avoir un système complet d'équations [homologues des équations (1), (2) et (3)], il reste à exprimer l'accroissement de Z_T en fonction des conditions de milieu, de Z_B , éventuellement du taux de croissance, de la température, etc., c'est-à-dire à faire une hypothèse sur le mécanisme ou la nature du processus de synthèse par lequel s'élabore la substance Z. Cette équation, que nous appellerons « hypothétique » pourra, suivant les mécanismes envisagés, prendre des formes très différentes. Cependant,

mis à part certains cas qu'il faudrait qualifier de pathologiques, l'équation hypothétique devra exprimer le fait que la concentration de tout constituant cellulaire ne saurait excéder une certaine limite. Soit X cette limite, qui s'exprimera par exemple comme fraction de la masse bactérienne x_B contenue dans le récipient B. L'équation hypothétique générale sera de la forme :

$$\frac{dZ_T}{dt} = (X - Z_B) \psi \quad (13)$$

dans laquelle ψ représente la fonction hypothétique proprement dite. En comparant les équations (11), (12) et (13), on voit que le système tend nécessairement vers un équilibre puisque

$$\frac{dZ_T}{dt}$$

diminue tandis que

$$\frac{dZ_P}{dt}$$

augmente lorsque Z_B augmente, et inversement ;

$$\frac{dZ_B}{dt}$$

tendra donc toujours vers zéro. Ceci à la condition que ψ ne prenne pas de valeurs infinies, hypothèse que l'on peut exclure *a priori*. Soit Z_E la valeur de Z_B à l'équilibre. La détermination de Z_E donne une mesure de la vitesse de la réaction de synthèse dans les conditions choisies, puisque à l'équilibre on peut écrire, d'après (11) et (12) :

$$\frac{dZ_T}{dt} = \frac{dZ_B}{dt} = Z_E D$$

Voyons maintenant comment varie Z_E suivant la forme de la fonction ψ , c'est-à-dire suivant l'hypothèse faite sur le mécanisme de la réaction (ou du système de réactions) de synthèse. Il est clair que toutes sortes de fonctions hypothétiques pourraient être envisagées suivant les variables et les phénomènes considérés. Nous nous bornerons ici à quelques cas simples et typiques, de nature à mettre en lumière les propriétés du système.

Supposons d'abord qu'on veuille étudier l'effet sur la synthèse de Z , d'une substance présente dans le milieu. Soit S la concentration de cette substance. Faisons, sur le mécanisme d'action de cette substance, l'hypothèse la plus simple possible : à savoir que la vitesse de la réaction de synthèse est proportionnelle à la concentration S . La fonction ψ devient alors :

$$\psi = KS$$

K étant une constante de proportionnalité.

L'équation hypothétique (13) s'écrit donc :

$$\frac{dZ_T}{dt} = (X - Z_R) KS. \quad (13 \text{ a})$$

Comme à l'équilibre on a :

$$\frac{dZ_T}{dt} = \frac{dZ_V}{dt} = Z_E D$$

et, par définition,

$$Z_R = Z_E.$$

On peut écrire en remplaçant

$$\frac{dZ_T}{dt}$$

et Z_R par leurs valeurs :

$$Z_E D = (X - Z_E) KS$$

d'où :

$$Z_E = X \frac{KS}{D + KS}. \quad (A)$$

Dans ce cas, comme on le voit, Z_E serait une fonction hyperbolique de D et de S . Sa valeur tendrait vers X lorsque S deviendrait grand, ou lorsque D tendrait vers 0. Z_E ne serait nul que pour $D = \infty$ ou $S = 0$. Les courbes figuratives de Z_E en fonction de S et de D sont données par les figures 2 et 3. Remarquons que dans ce calcul nous admettons implicitement que S est indépendant de D . C'est dire que la substance « active » dont il s'agit de déterminer l'effet ne saurait être l'aliment limitant. Il n'y a pas là, d'ailleurs, de difficulté. Il faut cependant prendre garde que la concentration S à l'équilibre n'est pas égale à la concentration S_0 dans le milieu neuf, si la substance active est métabolisée à un taux appréciable. Compte tenu de ces observations, la vérification expérimentale de l'hypothèse ainsi que la détermination de la valeur des constantes n'offrent pas de difficulté de principe.

Supposons maintenant que, conservant la même hypothèse quant à l'effet de la substance activante, nous fassions l'hypothèse supplémentaire que la réaction est *autocatalytique*, autrement dit que sa vitesse est à chaque instant proportionnelle à la concentration de la substance Z dans les cellules. L'équation hypothétique devient :

$$\frac{dZ_T}{dt} = (X - Z_R) KSZ_E. \quad (13 \text{ b})$$

Le même raisonnement que ci-dessus conduit à la solution suivante pour l'état d'équilibre :

$$Z_E = X - \frac{D}{KS}. \quad (B)$$

Les courbes figuratives de Z_E en fonction de D et de S , d'après l'équation (B) sont données par les figures 2 et 3. On voit que ces courbes sont bien différentes de celles auxquelles conduisait la première hypothèse [réaction non autocatalytique, équation (A)]. En particulier, Z_E est une fonction *linéaire* de D , et s'annule pour une valeur finie de la variable. Autrement dit, lorsque le débit augmente au delà de certaines valeurs, la sub-

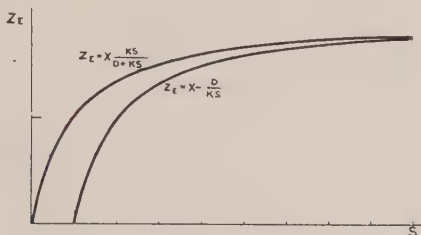


FIG. 2. — Courbes théoriques exprimant la variation de la concentration d'équilibre d'un constituant Z , en fonction de la concentration de l'inducteur S . Au-dessus : réaction non autocatalytique (équation A). Au-dessous : réaction autocatalytique (équation B).

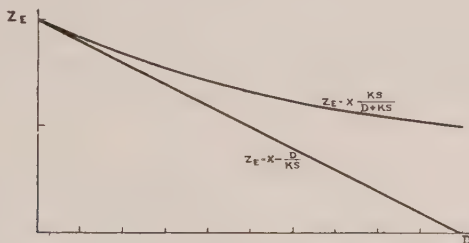


FIG. 3. — Courbes théoriques exprimant la variation de la concentration d'équilibre du constituant Z en fonction du taux de dilution D . Au-dessus : réaction non autocatalytique (équation A). Au-dessous : réaction autocatalytique (équation B).

stance Z n'est plus formée. De même Z_E devient nul lorsque la concentration de la substance active tombe au-dessous d'une valeur limite. A supposer que l'expérience ne puisse être faite pour ces valeurs critiques de D et de S , l'extrapolation doit permettre de distinguer entre des résultats expérimentaux qui vérifieraient soit l'équation A, soit l'équation B. La mesure de Z_E pour différentes valeurs du débit et de la concentration de la substance active permettrait donc de déterminer si le processus de synthèse du constituant Z est, ou n'est pas, doué des propriétés d'une réaction autocatalytique.

Les hypothèses exprimées par les équations (13 a) et (13 b) sup-

posent implicitement l'indépendance entre le taux de croissance et le taux de la réaction de synthèse. Si l'on supposait, au contraire, que le taux de cette réaction soit directement proportionnel au taux de croissance, μ , les termes D et μ disparaîtraient de la solution puisque au régime autorégulateur $D = \mu$. L'équation A deviendrait :

$$Z_E = X \frac{KS}{C + KS} \quad (A')$$

et l'équation B

$$Z_E = X - \frac{C}{KS} \quad (B')$$

C représente une constante. On voit que dans ce cas Z_E devient indépendant de D , quelle que soit d'ailleurs la forme de la fonction hypothétique. La détermination de Z_E en fonction de D permettrait donc d'établir éventuellement les limites de validité de « l'hypothèse d'indépendance ».

Nous avons supposé jusqu'ici, pour plus de simplicité, que la vitesse de la réaction de synthèse était *directement* proportionnelle à la concentration de la « substance active » S . On peut envisager aussi le cas, plus probable, où la réaction serait de nature enzymatique. Sa vitesse ne serait plus alors proportionnelle à S , mais à une fonction de S qui exprimerait le phénomène de saturation caractéristique des réactions enzymatiques. Si, par exemple, on adopte, pour cette fonction, la forme de l'équation de Michaelis :

$$v = V \frac{S}{S_K + S}$$

dans laquelle V représente la vitesse maximum et S_K la constante d'affinité, les équations (A) et (B) deviennent respectivement :

$$Z_E = VX \frac{S}{DS_K + DS + VS} \quad (A'')$$

et

$$Z_E = X - \frac{DS_K + DS}{VS}. \quad (B'')$$

On verra sans peine que les équations (A'') et (B'') conduisent à des prévisions expérimentales qui ne sauraient se confondre entre elles, ni avec les prévisions des équations homologues (A) et (B). L'expérience, fondée sur ces prévisions, peut donc en principe départager ces différentes hypothèses.

Si, au lieu de choisir comme variable la concentration d'une substance supposée « activante », nous avons introduit une constante de vitesse, supposée fonction d'une variable indépendante quelconque, les résultats eussent été les mêmes. Une telle variable indépendante serait par exemple la température. Nous

avons vu tout à l'heure que les conditions du régime autorégulateur pouvaient être ainsi fixées, que le taux de croissance soit indépendant de la température dans un intervalle assez large. On voit maintenant comment des variations de température, à taux constant, pourraient être utilisées pour l'analyse du mécanisme d'une réaction de synthèse.

On pourrait envisager encore beaucoup d'autres formes de l'équation hypothétique, destinées à exprimer toutes sortes de mécanismes. Mais il ne s'agit ici que d'exposer les principes. Les exemples que nous venons de discuter suffisent à montrer comment la mesure de la concentration d'un constituant cellulaire dans une culture continue parvenue à l'équilibre permet d'étudier, en fonction de diverses variables, les propriétés de la réaction de synthèse.

Les avantages, si considérables qu'ils soient en théorie comme en pratique, de cette méthode d'équilibre, ne doivent pas nous faire oublier qu'une culture continue se prête également, et bien mieux qu'une culture normale, à la mesure de l'accumulation (ou de la disparition) d'un constituant cellulaire en fonction du temps. Pour que l'emploi de cette seconde méthode soit justifié, il faut et il suffit que les conditions de culture (taux de croissance, débit, composition du milieu) ne varient pas au cours de l'essai. Ceci acquis, on dispose là d'un second moyen de vérifier par l'expérience les prévisions de l'équation hypothétique. En remplaçant

$$\frac{dZ_T}{dt} \quad \text{et} \quad \frac{dZ_P}{dt}$$

dans l'équation (11) par leurs valeurs tirées de (12) et de l'équation hypothétique (13) on obtient :

$$\frac{dZ_B}{dt} = K(X - Z_B)\psi - Z_B D$$

ou, sous forme intégrale :

$$\int \frac{dZ_B}{KX\psi - (K\psi + D)Z_B} = \int dt + Cte.$$

L'intégration donne Z_B en fonction du temps. Pour que l'expérience de vérification soit significative, il faut évidemment qu'au temps zéro la concentration Z_B soit différente de la concentration d'équilibre Z_E correspondant aux conditions choisies. Mais, et ceci est fort important, comme l'équilibre est réversible, il est indifférent que Z_B au temps initial soit plus petit ou plus grand que Z_E . Pratiquement, l'expérience consistera, une fois l'équilibre obtenu dans des conditions données, à modifier les conditions d'équilibre, puis à mesurer Z_B à intervalles adéquats, jusqu'à ce que le nouvel équilibre soit réalisé. En principe, on peut

imposer à une même culture une succession indéfinie de ces ruptures d'équilibre. Inutile d'insister sur la richesse des combinaisons expérimentales qu'offre cette technique.

Taux de mutation. — On ne peut ici que mentionner l'application possible de la technique de culture continue à l'étude des mutations bactériennes. Une véritable discussion de ce problème nous entraînerait trop loin. On sait que les théories relatives à la sélection des formes mutantes dans les populations bactériennes ne sont en général valables que pour des cultures en train de se multiplier à taux constant. De plus, l'hypothèse est presque toujours faite, mais n'a jamais été démontrée, que la probabilité de mutation est proportionnelle au taux de croissance. La vérification de cette hypothèse fondamentale semble possible avec les cultures continues à taux limité, de même que la détermination, à taux de croissance constant, des coefficients de température des fréquences de mutation.

III. — RÉALISATION.

A. *Appareillage.* — Les développements théoriques qui précèdent sont fondés sur des définitions assez rigoureuses des conditions de culture. Il serait vain de chercher à appliquer la théorie si les conditions expérimentales s'écartaient trop sensiblement de ces définitions. Divers types fort différents d'appareils peuvent être imaginés, qui permettraient sans doute de réaliser des conditions assez proches des exigences théoriques. Je n'en décrirai ici qu'un seul. Ce montage est schématisé par la figure 4.

La condition la plus importante est l'homogénéité de la culture, hors quoi la notion de « concentration d'équilibre » de l'aliment limitant devient illusoire. Il faut donc que la culture soit brassée continuellement, intégralement et rapidement. Il faut encore que l'équilibre avec la phase gazeuse soit assuré, ce qui entraîne que le rapport de la surface au volume soit grand. Dans le montage adopté, le récipient de culture est un ballon B, fixé et centré sur un support rotatif. La capacité du ballon est de deux litres pour un volume de culture de 100 à 400 cm³. Un moteur M imprime au ballon une vitesse de rotation de l'ordre de 200 à 400 tours/minute. Le brassage obtenu est très énergique : à cette vitesse, la dispersion d'une goutte de colorant introduite dans le liquide est pratiquement instantanée. L'aération est assurée par le film liquide qui recouvre la plus grande partie de la surface intérieure du ballon. La meilleure répartition de ce film liquide est obtenue quand l'axe de rotation fait un angle de 3 à 4 degrés avec l'horizontale.

Le milieu neuf est en réserve dans une nourrice, en l'occurrence

une fiole à toxine, placée 1,50 m. environ au-dessus du niveau du ballon. Le liquide passe dans une tubulure en caoutchouc et un serpentín (Srp) constitué par un tube capillaire en verre de 2 m. de long environ, pour aboutir à une pipette compte-gouttes. Le capillaire est choisi de diamètre tel que le débit moyen désiré soit obtenu lorsque l'extrémité du compte-gouttes est environ à 1 m. au-dessous du niveau de la nourrice. Le réglage se fait par déplacement vertical du compte-gouttes. On obtient ainsi un débit

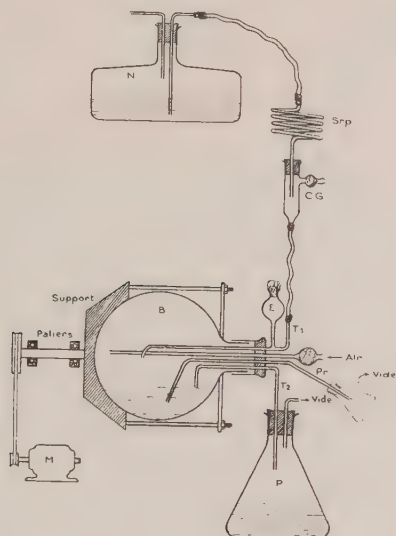


FIG. 4. — Montage d'un appareil à croissance continue. N, nourrice; Srp, serpentín capillaire; C.G., compte-gouttes; B, ballon rotatif; T₁, tubulure d'arrivée; E, tubulure d'ensemencement; Pr, tubulure de prélèvement (en pointillé, fiole de prélèvement); T₂, tubulure de niveau; P, produit; M, moteur.

suffisamment stable, sans qu'il soit indispensable de maintenir rigoureusement constant le niveau du liquide dans la nourrice. Le compte-gouttes, calibré par pesées, permet une mesure précise du débit à l'aide d'un chronographe.

Le volume du liquide en B est maintenu constant, quel que soit le débit, grâce à une tubulure de niveau (T₂) aboutissant à un récipient P, dans lequel on entretient un vide suffisant et où s'accumule le « produit ». Le volume constant ne dépend pas seulement du niveau de la tubulure T₂ mais aussi de la vitesse de rotation qui détermine l'épaisseur, nullement négligeable, du film liquide. Un accroissement de vitesse non compensé par un changement du niveau de la tubulure T₂ se traduit par un accrois-

sement de volume et inversement. Pour tenir compte de cet effet on détermine le volume par pesée, après essai dans les conditions choisies.

Le système comporte en outre une tubulure munie d'un filtre en coton, par où de l'air (ou tout autre mélange gazeux approprié) est envoyé dans le ballon, après avoir passé dans un flacon laveur contenant de l'eau. Une tubulure d'ensemencement (E), et une tubulure de prélèvement (Pr) peuvent utilement compléter le dispositif.

Le col du ballon est protégé par une pièce annulaire en verre, portée par un bouchon de caoutchouc à travers lequel passent les tubulures.

L'appareil est monté dans une chambre-étuve portée à la température voulue.

B. *Conduite des expériences.* — L'ensemble nourrice — compte-gouttes — tubulures est stérilisé d'un part, le ballon de l'autre. Le montage est fait stérilement. Le ballon est rempli par la tubulure E d'une « culture de départ » à densité convenable. Le débit est amorcé en créant une dépression temporaire dans l'ampoule du compte-gouttes. Les prélèvements directs sont faits en abouchant une fiole à vide à l'extrémité de la tubulure « Pr ».

Ceci dit, tout dépendra du type d'expérience envisagé. Quel qu'il soit, cependant, certaines précautions devront être respectées :

1° La densité bactérienne à l'équilibre ne doit jamais être telle que des facteurs inconnus ou incontrôlés (vitesse de dissolution de l'oxygène, par exemple) ne deviennent limitants. Aussi est-il sage de ne pas dépasser 0,3 à 0,5 μg de poids sec par centimètre cube, et d'utiliser des cultures plus diluées chaque fois que c'est possible. Lorsqu'on peut se contenter de cultures très diluées (0,05 μg par centimètre cube par exemple), il est facile de composer les milieux de façon que la « concentration d'équilibre » des aliments autres que l'aliment limitant soit pratiquement la même que dans le milieu neuf. Ce qui simplifie l'expérience, les calculs et les interprétations.

2° Les prélèvements directs modifient le volume en B, par conséquent le taux de dilution, d'où rupture d'équilibre. Il faut donc qu'ils soient assez petits pour que l'écart soit négligeable, ou assez espacés pour que le système soit entre-temps revenu à l'équilibre. Lorsqu'il n'est pas nécessaire d'effectuer le prélèvement à un moment bien défini (détermination d'un état d'équilibre), on peut avec avantage recueillir le « produit » au lieu de prélever directement.

3° Les conditions dans l'échantillon prélevé changent radicalement et *très rapidement* : ainsi la disparition de l'aliment limitant peut n'être l'affaire que de quelques secondes. Le traitement adéquat doit donc être appliqué *immédiatement*. Le plus efficace

et le plus généralement applicable consiste à recevoir l'échantillon sur de la glace pilée.

4° Les risques de contamination, avec cet appareillage, ne sont pas négligeables. Nous n'en avons pas observé cependant au cours de nombreuses séries d'expériences d'une durée maximum de sept à huit heures. Le montage décrit n'est pas conçu pour un fonctionnement permanent.

IV. — CONCLUSIONS ET COMMENTAIRES.

1° Le maintien d'une culture bactérienne, à densité constante, à taux de croissance constant, dans un milieu de composition constante est possible en théorie et réalisable en pratique, grâce au principe de « dilution continue à volume constant ».

Pour qu'un tel système soit en équilibre, il faut et il suffit que le taux de dilution (rapport du volume débité par unité de temps au volume de la culture) soit égal au taux de croissance (nombre de divisions par heure) multiplié par le coefficient 0.69 (logarithme népérien de 2). Ce résultat peut être atteint de deux façons différentes : a) en ajustant le taux de dilution de façon qu'il équilibre le taux de croissance maximum ; cet équilibre est instable ; il ne peut être maintenu que par ajustements continuels ; b) en laissant croître la culture jusqu'à ce qu'une condition devienne limitante (concentration d'un aliment essentiel), le taux de dilution étant fixé à une valeur inférieure à celle qui équilibre le taux de croissance maximum. Cet équilibre est stable. Le taux de croissance est alors limité par la concentration d'un aliment, concentration déterminée elle-même par le taux de dilution (régime autorégulateur).

2° Avec une culture continue en régime autorégulateur, l'expérimentateur dispose d'un moyen de fixer le taux de croissance à toute valeur voulue inférieure au maximum. *Autrement dit, le taux de croissance devient, dans une certaine mesure, une variable indépendante.* C'est là une ressource expérimentale précieuse ; inutile d'insister, dans ce résumé, sur ses nombreuses applications possibles. En revanche, il faut souligner le danger qu'il y aurait à s'en prévaloir, dans l'interprétation des expériences, pour traiter le taux de croissance comme une variable univoque et abstraite. Le « réglage » du taux de croissance, dans une culture continue, est obtenu par l'intervention d'un facteur limitant. Beaucoup d'éléments d'interprétation dépendent de la nature du facteur limitant, de ses effets sur la composition et le métabolisme des bactéries, etc...

3° Les cultures continues se prêtent particulièrement bien à l'étude de la cinétique des processus de synthèse. La composition d'une cellule en train de croître, entendue comme le rapport de

chaque constituant cellulaire à la masse totale, tend vers un équilibre lorsque le taux de croissance est constant. La concentration de chaque constituant cellulaire, à l'équilibre, dépend des constantes de vitesse du processus de synthèse intéressé. La détermination de l'équilibre obtenu (c'est-à-dire la mesure de la concentration stable d'un constituant cellulaire), en fonction de diverses variables, revient à déterminer l'effet de ces variables sur la vitesse du système de réactions par quoi s'élabore ce constituant. Cette méthode d'équilibre présente évidemment de grands avantages théoriques et pratiques. Elle permet de comparer des modèles théoriques à des résultats expérimentaux dans des conditions telles que beaucoup de facteurs « étrangers » soient annulés, ou plutôt maintenus constants. En somme, la technique de culture continue appliquée à l'étude de ces difficiles problèmes permet de gagner quelques degrés de liberté dans l'expérimentation. Mais ici encore la simplification du problème expérimental ne doit pas créer l'illusion que les phénomènes eux-mêmes soient simplifiés. Fût-il entièrement satisfaisant, le modèle théorique d'un processus de synthèse n'est qu'une représentation partielle d'une somme de phénomènes. Il n'y a pas à craindre, d'ailleurs, que les résultats ne s'accommodent trop aisément d'interprétations naïvement mécanistes. Ces quelques degrés de liberté supplémentaires donnent au contraire le moyen de mettre les schémas théoriques à plus rude et plus sévère épreuve.

4° La technique de culture continue trouverait sans doute des applications intéressantes dans l'analyse de la mutabilité. Mais il faut à ce propos mentionner une difficulté qui n'a pas été envisagée dans la discussion théorique. On a, pour cette discussion, supposé implicitement que les cultures étaient génétiquement homogènes. Homogènes tout au moins en ce qui concerne les caractères ou propriétés en cause. Dans l'expérimentation, au contraire, on ne peut négliger *a priori* les facteurs de sélection. L'hypothèse que la sélection intervient doit être considérée dans tous les cas, ne fût-ce que pour l'éliminer par des contrôles adéquats (Monod, Torriani et Doudoroff, 1950). Savoir comment en tenir compte, ou l'éliminer, quels contrôles faire, dépend du problème envisagé et ne peut être discuté ici.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MONOD (J.). Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Actualités scientifiques et industrielles. Hermann, éd., Paris, 1942. *Ann. Rev. Microb.*, 1949, **3**, 371.
- [2] MONOD (J.), TORRIANI (A. M.) et DOUDOROFF (M.). Ces *Annales* (sous presse).
- [3] TEISSIER (G.). *La Revue Scientifique*, 1942, 209-214.

ÉTUDE CYTOLOGIQUE D'*ENDOSPORUS AZOTOPHAGUS*

par T. L. WANG et Y. T. TCHAN.

(Institut Pasteur. Laboratoire de Microbie technique.)

Endosporus azotophagus, isolé et identifié récemment par nous [1], présente, au point de vue morphologique, quelques particularités et il nous semble intéressant de lui consacrer une étude cytomorphologique détaillée.

Il est admis actuellement que les corps chromatiques des bactéries jeunes sont assez facilement colorables après une hydrolyse appropriée (Robinow, Boivin, etc.) [2]. L'un de nous a pu le confirmer en microscopie électronique. Cependant, les travaux de Krzemieniewski ont montré un cycle nucléaire complexe chez les Myxobactéries [2 bis] sans aucune hydrolyse. En 1933, Badian [3] signale les faits de fusion nucléaire chez les bactéries évoquant l'idée de sexualité. Klieneberger-Nobel (1945) [4] l'observe chez les germes sporulés, Bisset (1949) [5] chez les germes non sporulés. L'ensemble des travaux semble conduire à la conclusion que l'appareil nucléaire des bactéries jouerait le rôle des chromosomes des êtres supérieurs.

Chez *End. azotophagus*, on peut facilement observer l'appareil nucléaire quel que soit l'âge de la culture.

TECHNIQUE. — La culture est faite dans le milieu de Winogradsky avec 5 p. 1.000 de mannite. Le pH est ajusté à 6,8 au lieu de 7,2 comme indiqué par Winogradsky.

Pour l'étude de la germination des spores, on prélève II gouttes de culture âgée chargée de spores (un mois et demi environ) toutes les cinq minutes et pour la croissance normale toutes les quatre heures.

Les prélèvements sont fixés à l'acide osmique pour l'étude du noyau et au liquide de Bouin pour la membrane.

L'hydrolyse est réalisée avec HCl N à 60° pendant dix minutes suivant la technique de Robinow, sauf pour les cellules âgées de plus de cinq jours (on n'hydrolyse alors que pendant quatre à cinq minutes). La membrane a été colorée en suivant exactement la technique de Robinow au violet cristal.

GERMINATION DES SPORES. — Partant d'une culture âgée de un mois et demi, on observe des spores légèrement ovalaires

dans la préparation. Ces spores tiennent très mal la coloration de Ziehl-Neelsen. Le noyau observé, après la digestion chlorhydrique, par coloration avec le Giemsa, se montre comme un petit point violet foncé tandis que le cytoplasme est très homogène et violet. Quand la germination commence, on voit une zone claire autour du noyau. Le noyau se déplace alors vers une extrémité de la cellule ; en même temps la membrane se colore d'une façon plus foncée. Enfin le noyau arrive à toucher la membrane. Il la traverse sans qu'il y ait eu éclatement de cette dernière, comme il est signalé dans certaines observations anciennes. Il n'y a pas non plus résorption de la membrane, comme l'a montré Knaysi (1945) [6] (fig. 1, images *a*, *b*, *c*, *d*).

Le noyau, une fois sorti, se présente sous la forme d'un petit

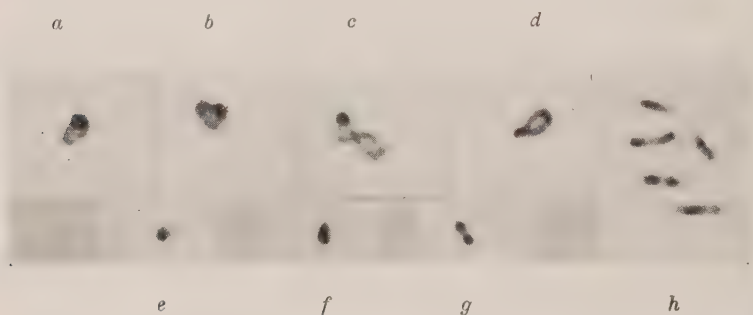


FIG. 4. — Germination des spores et formation des cellules jeunes.

point rouge vif sans cytoplasme apparent. La membrane de la spore privée de noyau se contracte et disparaît (image *e*).

La durée de la germination est environ de trente à quarante-cinq minutes. Celle-ci commence cinq minutes après transfert sur un milieu favorable.

Le noyau libre, en même temps qu'il grossit, ne tarde pas à se diviser en deux. On le voit sous forme de diplocoque. Après un certain temps, il se forme autour des deux grains chromatiques une couche très mince de cytoplasme qui s'agrandit et s'allonge. Les noyaux se dirigent vers chaque extrémité de la cellule. Ils se divisent en deux groupes de 2 ou 3 grains chromatiques irréguliers à chaque extrémité de la cellule. A partir de ce moment, la division cellulaire commence en donnant deux cellules-filles normales (images *f*, *g*, *h*).

DIVISION CELLULAIRE. — Comme nous l'avons montré chez *Azotobacter*, il existe aussi avec *Endosporus azotophagus* un retard de la division cellulaire sur la division nucléaire: la cellule s'allonge

progressivement avec augmentation du nombre des granules. Elle ne se divise pas et finit par avoir un aspect d'un long filament bourré de grains chromatiques. Après un certain temps, le long filament se divise en un certain nombre de cellules normales, soit par une constriction, soit par une élimination d'une partie du cytoplasme ne contenant pas de noyau. Il arrive parfois que ces longs filaments se cloisonnent en donnant des cellules-filles qui ne tardent pas à perdre leur membrane en donnant chacune un grain violet très foncé. Nous ne pouvons pas confirmer ni infirmer l'hypothèse des granules bactériogènes (Seguin et Boisvert), car nous n'avons

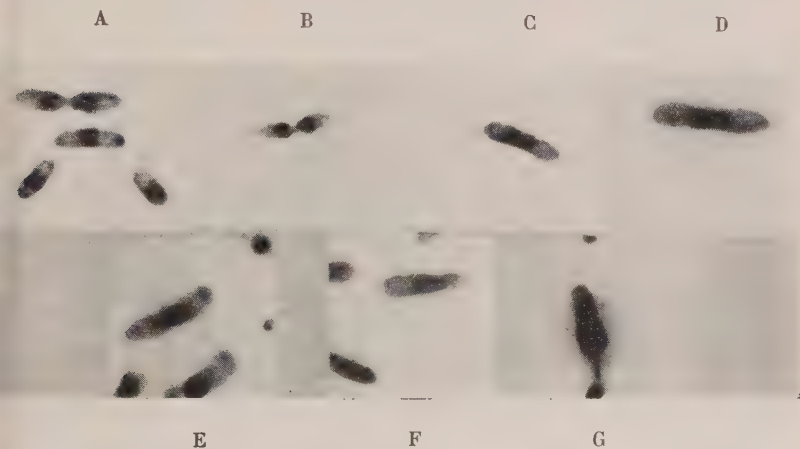


FIG. 2. — Fusion nucléaire et formation de la spore.

pas pu observer leur régénérescence en cellules végétatives à cause de leur rareté et la possibilité de les confondre avec les granules provenant de la germination des spores.

La cellule adulte se présente en court bâtonnet avec un noyau central de forme irrégulière. Au début de la maturation, on voit la cellule se gonfler un peu, surtout au milieu. Elle prend une forme en massue ou ovale, en même temps le noyau s'arrondit, puis, après quelques jours, elle entre dans un stade tout à fait particulier qui peut être interprété de façon différente, correspondant aux deux descriptions suivantes :

I. — Les cellules de forme ovale ont un noyau central rond, coloré en rouge très foncé. Le cytoplasme reste rose. Le noyau se déplace vers une des extrémités de la cellule. Le cytoplasme du côté opposé au noyau se décolore peu à peu. La cellule prend alors la forme d'une massue. Il semble qu'il y ait une sorte d'attraction ou de déplacement des cellules qui se mettent en

paire avec les noyaux en regard. Un allongement de chaque cellule amène en contact les deux parois. Au point de contact, les membranes disparaissent. La fusion nucléaire se produit. Un des noyaux passe progressivement dans l'autre cellule et la fusion commence. Ainsi deux cellules donnent naissance par contraction à une cellule-fille, grande et ovale avec un noyau rond à une extrémité (fig. 2, images A, B, C, D, E).

Si la fusion nucléaire est en avance sur la fusion cytoplasmique, la cellule, ayant perdu son noyau et une partie de son cytoplasme par la fusion, s'atrophie. On voit alors apparaître une sorte de hernie, accrochée sur la cellule-fille. D'ailleurs elle ne subsiste que pendant peu de temps. Elle disparaît peu à peu par autolyse (image F).

Finalement on a une grande cellule-fille ovale avec un noyau subterminal (image G).

II. — On pourrait interpréter autrement ces images nucléaires. Il n'est pas impossible que cette succession de formes soit due simplement à une division cellulaire d'un type spécial. Partant d'une cellule en massue, le cytoplasme s'allonge, puis il se produit une division de l'appareil nucléaire. Les deux cellules-filles se séparent en gardant chacune un grain chromatique. Cependant, il serait difficile, dans ce cas, d'expliquer l'existence de cette hernie que nous avons décrite plus haut. En effet, elle est séparée de la cellule à laquelle elle est accolée, par une membrane très nette, colorable par la méthode au violet cristal. Il faut remarquer que cette hernie n'a rien à voir avec le vestige de l'élimination d'une fraction de cytoplasme chez les cellules jeunes, car entre ces deux phases, d'une durée de quelques jours, on ne voit pas de cellules possédant un pareil appendice. D'ailleurs, une différence très importante de morphologie entre ces deux types de cellules nous laisse supposer qu'il n'y a pas lieu de les confondre.

SPORULATION. — Badian (1933) a observé que les éléments nucléaires fusionnent en une masse puis se divisent en quatre grains avant la formation de la spore. Un des corps nucléaires reste dans la spore et les trois autres disparaissent. Flewett [7] l'a confirmé en 1948.

Chez les *Endosporus azotophagus*, les cellules, avant la formation de la spore, présentent un noyau foncé rond, situé à une extrémité de la cellule. Au cours de la sporulation les éléments nucléaires se modifient de la façon suivante :

SPORULATION CLASSIQUE. — Le premier type de sporulation est classique, c'est-à-dire que l'on voit, tout d'abord, une zone de plus en plus claire autour du noyau, où une membrane apparaît

progressivement. Avant que la membrane des spores soit bien formée, le noyau se divise en deux grains : l'un est généralement plus grand, l'autre, le plus petit, reste en dehors de la membrane. Finalement, le cytoplasme intérieur de la membrane devient de plus en plus foncé, et le cytoplasme extérieur, au contraire, s'éclaircit. A l'intérieur de la membrane le noyau se contracte en un petit point. Le cytoplasme devient ensuite tellement coloré, que l'observation du noyau est impossible. En même temps le petit granule expulsé de la spore disparaît ainsi que le restant de la cellule. En somme, chez *Endosporus azotophagus*, nous avons également trouvé les phénomènes de la réduction chromatique.

Il existe un autre mode de sporulation chez *Endosporus azotophagus*. Dans une cellule en forme de massue, le grain chromatique unique se divise en deux granules dont l'un se dirige peu à peu vers l'autre extrémité de la cellule qui devient alors nettement ovulaire. Les deux grains chromatiques s'accolent alors contre la paroi de la cellule. Une membrane se forme autour d'un des grains et constitue finalement la spore. L'autre grain dégénère ; il y a donc, ici encore, élimination chromatique.

DISCUSSION ET CONCLUSION. — La germination des spores d'*Endosporus azotophagus* présente, par ses particularités, un certain intérêt théorique : A la limite de la visibilité en microscopie optique ordinaire, il est possible d'observer et de décrire un mode spécial de germination.

D'autre part, on peut formuler l'hypothèse d'une fusion nucléaire, évoquant l'idée d'une sexualité. Cependant, ces hypothèses sont encore à vérifier et à confirmer pour pouvoir être considérées comme définitives.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] TCHAN (Y. T.) et POCHON (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230**, 417-418.
TCHAN (Y. T.). *Ces Annales*, 1950, **79**, 299.
- [2] BOIVIN (R.), VENDRELY et TULASNE (R.). *Arch. Sci. Physiol.*, 1947, **1**, 19, 325.
TCHAN (Y. T.) et GIUNTINI (J.). *Ces Annales*, 1949, **77**, 185.
GIUNTINI (J.) et TCHAN (Y. T.). *Ces Annales*, 1949, **77**, 188.
- [2 bis] KRZEMIENIEWSKI (H. et S.). *Acta Soc. Bot. Polon.*, 1946, **5**, 10.
- [3] BADIAN. *Arch. Mikrob.*, 1933, **4**, 409.
- [4] KLIENEBERGER-NOBEL (E.). *J. Gen. Microb.*, 1947, **1**, 33 ; *J. Hyg.*, 1948, **44**, 99.
- [5] BISSET (K. A.). *J. Gen. Microb.*, 1948, **2**, 248 ; *J. Hyg.*, 1948, **4**, 409.
- [6] KNAYSI. *J. Bact.*, 1945, **49**, 617.
- [7] FLEWETT. *J. Gen. Microb.*, 1948, **2**, 325.

**NOUVELLES RECHERCHES
SUR LE TACTISME LEUCOCYTAIRE.
TACTISME ET OXYDATIONS CELLULAIRES.**

par JACQUELINE LEBRUN-PAGÈS et ROGER ROBINEAUX (*).

(Institut Pasteur, C. N. R. S. et Institut National d'Hygiène.)

Au cours de recherches antérieures, l'un de nous a étudié avec A. Delaunay les différents facteurs qui conditionnent l'exercice du tactisme leucocytaire *in vitro* [1, 2, 3].

Nous rappellerons brièvement les conclusions auxquelles ont abouti ces recherches qui mettaient en œuvre la technique classique de Comandon [4].

a) L'absence d'ion Ca dans un milieu sérique, réalisée par blocage de cet ion au moyen du citrate de sodium ou précipitation sous forme d'oxalate de calcium insoluble, entraîne une inhibition totale du tactisme. Cette action est neutralisée par addition au milieu d'une quantité suffisante de Cl_2Ca .

b) L'emploi de milieux synthétiques nous a montré, d'autre part, que la présence d'ion Ca n'est pas une *condition suffisante* pour que le phénomène s'exerce normalement.

c) Il faut en outre une certaine quantité de sérum sanguin. Le principe ici nécessaire offre toutes les propriétés physico-chimiques qu'on reconnaît d'ordinaire au complément ou alexine.

Nos observations d'abord faites avec des leucocytes d'exsudats de cobayes ont été récemment confirmées avec des suspensions de polynucléaires du sang humain [5].

Dans un travail récent, Allgöwer [6] a montré, lui aussi, que la migration des leucocytes humains dépend de deux facteurs au moins : les ions calcium libres et ce qu'il appelle le « facteur sérique ».

Le mode d'action des substances nécessaires au tactisme est resté jusqu'alors aussi mal connu que le mécanisme du tactisme lui-même. Nous avons cependant émis l'hypothèse que le complément pouvait agir comme catalyseur d'oxydation cellulaire. Les résultats que nous apportons aujourd'hui prolongent nos premières recherches, tout en ouvrant la voie à un nouveau champ d'investigations.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 juillet 1950.

MÉTHODE D'EXAMEN. — Le déplacement orienté des leucocytes vers des substances qui les attirent peut être facilement observé *in vitro* grâce à une technique utilisée en microcinématographie par Comandon [4]. Des grains d'amidon isolés extemporanément de la pomme de terre sont étalés sur lames et fixés par dessiccation. Si l'on dépose sur des lames ainsi préparées une suspension de polynucléaires dans du sérum sanguin frais et que l'on recouvre d'une lamelle, on observe à 37° une migration des cellules vers les grains qui, en moins d'une heure, se trouvent sertis par une couronne de leucocytes étroitement accolés à leur surface.

I. RÔLES RESPECTIFS DU CALCIUM ET DU COMPLÉMENT DANS LE DÉROULEMENT DES PHÉNOMÈNES DE CHIMIOTACTISME. — Lorsque l'on songe à l'inhibition qu'exerce le citrate de sodium, on peut se demander si cette action est due au blocage du calcium du milieu, ou bien à une inactivation du complément. En effet, différents auteurs (Bordet [7], Agasse-Lafont, Grimberg et Mutermilch[8]) ont signalé que le citrate de sodium entrave la production des processus lytiques en empêchant la fixation d'alexine ; ils ont noté, de plus, que cette propriété était neutralisée par addition au milieu de sels solubles de calcium. Nous avons d'ailleurs montré, par nos expériences couplées de tactisme et de dosage du complément selon la méthode hémolytique dans nos sérums citratés, l'existence d'une relation constante entre l'inhibition du tactisme et celle de l'hémolyse.

On était donc tenté de croire que, dans ce cas, le calcium que nous ajoutons aux sérums citratés pour les rendre à nouveau propres au tactisme agissait moins par une intervention directe sur le leucocyte qu'en redonnant au complément sa liberté d'action. Un fait cependant est en contradiction avec un tel point de vue : traitons un sérum frais de cobaye, non par le citrate, mais par l'oxalate de sodium (1 cg. par centimètre cube), puis éliminons par une simple centrifugation le précipité d'oxalate de calcium. Le sérum est alors rendu impropre au tactisme *mais le pouvoir hémolytique du complément est conservé*.

Quelques auteurs ont d'ailleurs déjà mentionné cette conservation du pouvoir complémentaire dans les sérums oxalatés [7].

On peut donc observer *une inhibition totale du tactisme malgré la présence d'une quantité convenable d'alexine*, et ceci en raison de l'élimination totale du calcium du milieu : *Le calcium et le complément paraissent aussi indispensables l'un que l'autre au déroulement normal du tactisme*.

Nous allons voir qu'en fait, ces deux conditions sont subordonnées à une troisième.

II. TACTISME ET OXYDATIONS CELLULAIRES. — L'action du cyanure de sodium sur la respiration cellulaire est, à l'heure actuelle, bien

connue. On sait exactement à quel stade le cyanure bloque les processus oxydatifs. On sait aussi que le comportement des différents tissus varie dans d'assez larges mesures en présence de cette substance ; tandis que le tissu nerveux, par exemple, est extrêmement sensible au blocage de sa respiration, d'autres, au contraire, capables de vivre en anaérobiose, ne donnent que peu ou ne donnent pas de signes de souffrance. Tels sont en particulier les tissus des tumeurs (Warburg [9]) et les cellules des tissus embryonnaires (Laser [10], Verne [11]).

Les polynucléaires ont été peu étudiés de ce point de vue ; cependant les travaux de Fleishman [12] et, plus récemment, des observations de Schrek [13] indiquent que ces cellules seraient capables de survivre aussi longtemps en absence d'oxygène qu'en sa présence.

On pouvait se demander si les polynucléaires conservaient dans les conditions de vie anaérobie, non seulement leur aspect normal, mais aussi leurs diverses propriétés physiologiques. Leur activité chimiotactique semblait particulièrement intéressante à étudier à cet égard, étant donné l'hypothèse précédemment émise d'une intervention du complément comme catalyseur d'oxydation au cours des phénomènes de tactisme.

Nous avons donc fait simultanément des mesures de métabolisme respiratoire à l'aide de l'appareil de Warburg et des expériences de tactisme avec des polynucléaires d'exsudat péritonéal de cobaye ; celui-ci était obtenu par deux injections intrapéritonéales de bouillon stérile (voir description détaillée des méthodes utilisées dans les notes précédentes) [1, 2, 3].

Après un lavage à l'eau physiologique, les polynucléaires étaient mis en suspension dans un milieu sérique contenant du cyanure de sodium à différentes concentrations.

Les solutions de cyanure étant fortement alcalines et, d'autre part, l'ajustement à un pH physiologique par simple addition d'acide chlorhydrique déterminant le déplacement de l'acide cyanhydrique et par conséquent l'altération du produit, nous avons eu recours au sérum de cobaye comme milieu tampon.

Nous nous sommes assurés de l'efficacité d'un tel tampon. Le cyanure de sodium dissous directement dans du sérum à raison de 1/2.000 (soit : 0,5 mg. par centimètre cube) a pour pH : 8 environ. Aleanité parfaitement convenable pour le tactisme *in vitro*.

Nous avons utilisé les concentrations suivantes de cyanure :

1° CNNa à 1/1.000, soit 1 mg. par centimètre cube ;

2° CNNa à 1/2.000, soit 0,5 mg. par centimètre cube ;

3° CNNa à 1/4.000, soit 0,25 mg. par centimètre cube.

1° CYANURE DE SODIUM A 1/1.000. — *Respiration*. — Moyenne des mesures :

En présence de cyanure : $0,01 \text{ mm}^3$ d' O_2 par million de cellules et par heure.

Témoin sans cyanure : $0,33 \text{ mm}^3$ d' O_2 par million de cellules et par heure.

Etat des cellules. — Après deux heures de contact, de nombreuses cellules sont altérées et agglutinées.

Tactisme. — Nul. Après centrifugation et lavage à l'eau physiologique, les cellules sont remises en suspension dans un milieu sérique, mais une forte agglutination s'est produite. Les quelques cellules qui restent isolées (20 p. 100 environ) présentent alors un tactisme normal.

2° CYANURE DE SODIUM A 1/2.000. — *Respiration.* — Moyenne des résultats obtenus :

Cellules en présence de cyanure : $0,07 \text{ mm}^3$ d' O_2 par million de cellules et par heure.

Témoin sans cyanure : $0,28 \text{ mm}^3$ d' O_2 par million de cellules et par heure.

Etat des cellules. — Satisfaisant ; peu ou pas d'agglutination.

Tactisme. — Nul. Les cellules d'aspect normal restent arrondies et ne s'accrochent pas aux grains d'amidon.

Lavées à l'eau physiologique et remises en suspension dans du sérum pur ou dilué au demi, toutes les cellules présentent un tactisme aussi marqué que les cellules témoins. A cette concentration de 1/2.000, le cyanure ne semble aucunement toxique pour les polynucléaires. Après douze heures de contact dans un tel milieu, l'état des cellules conservées à la glacière (pour inhiber l'action des diastases protéolytiques toujours libérées en petite quantité) est aussi convenable que celui des témoins. Le tactisme est toujours inhibé mais reparait après lavage.

3° CYANURE DE SODIUM A 1/4.000. — *Respiration.* — Moyenne des résultats obtenus :

Cellules en présence de cyanure : $0,20 \text{ mm}^3$ d' O_2 par million de cellules et par heure.

Témoin sans cyanure : $0,29 \text{ mm}^3$ d' O_2 par million de cellules et par heure.

Etat des cellules. — Satisfaisant.

Tactisme. — Normal. La conservation des polynucléaires dans un tel milieu est aussi bonne que dans du sérum sans cyanure.

DISCUSSION. — Les résultats que nous venons d'exposer peuvent être résumés ainsi : En utilisant une concentration de cyanure de sodium telle qu'elle inhibe considérablement la respiration des polynucléaires (de 75 à 80 p. 100), mais n'est pas toxique pour ces cellules, soit 1/2.000 de CNNa dans du sérum sanguin, on constate une inhibition totale du tactisme leucocytaire. Lorsque le

cyanure a été complètement éliminé du milieu par lavage, le tactisme réapparaît même après un temps de contact prolongé.

Nous avons recherché si le cyanure supprimait le tactisme par action sur l'un ou l'autre des éléments qui interviennent au premier chef dans le déroulement de ce phénomène.

a) *Calcium*. — Le cyanure ne bloque pas le calcium à la manière du citrate de sodium. Ainsi, dans un sérum citraté, le calcium n'est plus précipitable par l'oxalate de sodium ; dans les sérums additionnés de cyanure, au contraire, la précipitation se fait normalement.

Nous avons, d'autre part, ajouté aux sérums contenant du cyanure à raison de 1/2.000, une surcharge de calcium de 0,25 à 0,50 mg. par centimètre cube. Dans aucun cas, cette addition de calcium n'a rétabli le tactisme.

b) *Complément*. — Nous avons recherché l'action de diverses concentrations de cyanure sur l'une des propriétés les plus évidentes du complément : son pouvoir hémolytique à l'égard des globules rouges de moutons sensibilisés.

Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode hémolytique classique, couramment employée dans le premier temps de la réaction de Calmette et Massol.

Les lectures faites après une demi-heure de séjour à l'étuve à 37° ont donné les résultats suivants :

CNNa à 2 p. 1.000 in sérum frais.	Hémolyse totale dans les 3 premiers tubes.
CNNa à 1 p. 1.000 in sérum frais.	Hémolyse totale dans les 3 premiers tubes.
CNNa à 0,5 p. 1.000 in sérum frais.	Hémolyse totale dans les 3 premiers tubes.
Témoin : Sérum frais	Hémolyse totale dans les 3 premiers tubes.

Sachant que certaines substances inhibitrices d'enzymes comme le gaz moutarde ne détruisent le complément qu'après un certain temps de contact, nous avons dosé l'alexine dans les sérums additionnés de cyanure et conservés vingt-quatre et quarante-huit heures à la glacière. L'hémolyse s'est produite aussi rapidement et aussi totalement que dans les sérums fraîchement cyanurés. *Le cyanure n'a donc aucune action sur le pouvoir hémolytique du complément, même après deux jours de contact.*

CYANURE ET MOUVEMENTS AMIBOÏDES. — Observant le comportement des cellules dans du sérum chargé de cyanure, sous un microscope placé dans une chambre-étuve, nous avons pu constater que les polynucléaires restent capables d'émettre de courts pseudopodes. C'est donc bien l'attraction des cellules vers les grains d'amidon et l'accolement des éléments que le hasard a placés au contact de ces grains qui ne se font plus.

CONCLUSIONS. — Le tactisme des polynucléaires fait défaut *in vitro*, même en présence d'ion calcium et d'alexine, lorsque le

milieu renferme une certaine quantité de cyanure de sodium. On est naturellement tenté d'établir un rapport entre l'inhibition puissante exercée dans ce cas par le cyanure et l'effet de cette substance sur les oxydations et les fonctions catalytiques de nombreux enzymes.

Aussi, pensons-nous de plus en plus que les phénomènes de tactisme se trouvent liés à des processus oxydatifs particuliers.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. DELAUNAY et J. PAGÈS. *C. R. Acad. Sci.*, 1945, **220**, 798.
- [2] A. DELAUNAY et J. PAGÈS. *Ces Annales*, 1946, **72**, 458.
- [3] A. DELAUNAY et J. PAGÈS. *Rev. Immunol.*, 1946, **10**, 33.
- [4] J. COMANDON. *Ces Annales*, 1920, **34**, 1.
- [5] R. ROBINEAUX et J. LEBRUN. *Soc. d'Hématol.*, séance du 15 février 1950.
- [6] M. ALLGÖWER. *Experientia*, 1949, **5**, 405.
- [7] J. BORDET. *Traité de l'Immunité*, 1 vol., Masson, édit., Paris, 1939, p. 515 et suiv.
- [8] E. AGASSE-LAFONT, A. GRIMBERG et S. MUTERMILCH. *Monde Médical*, 1938, **923**, 769.
- [9] O. WARBURG. *Métabolisme cellulaire et métabolisme des tumeurs*, 2 vol., Félix Alcan, édit., Paris, 1927.
- [10] H. LASER. *Bioch. Zeitschr.*, 1933, **264**, 72.
- [11] J. VERNE. *J. Physiol.*, 1948, **40**, 1.
- [12] W. FLEISHMAN et F. KUBOWITZ. *Bioch. Zeitschr.*, 1926, **181**, 395.
- [13] M. R. SCHREK. *Arch. Path.*, 1944, **37**, 319.

LE CONTROLE BACTÉRIOLOGIQUE DES PRODUITS BIOLOGIQUES AU MOYEN D'UN MILIEU PERMETTANT LA CULTURE A L'AIR LIBRE DES GERMES AÉROBIES ET ANAÉROBIES

par P.-H. BONNEL

[avec la collaboration de MM. R. ARDRY, R. CHARY, F. HÉNAFF,
B. MAUPIN, H. PERROT et M.-P. ROBERT] (*).

*(Service Central de Transfusion-Réanimation de l'Armée.
Directeur : J. JULLIARD.)*

Les produits biologiques d'origine humaine ou animale tels que le sang conservé et le plasma sont, dans certaines conditions, des milieux favorables à la croissance de la plupart des germes. Aussi est-il indispensable de contrôler la stérilité de ces produits avant de les distribuer, quelles que soient les précautions prises lors des étapes successives de leur préparation. Ce contrôle se fait habituellement en ensemençant un ou plusieurs milieux appropriés avec une certaine quantité du produit, et en vérifiant, après une incubation convenable, s'il s'est développé ou non des germes de souillure. Ce sont là méthodes de bactériologie courantes mais, à la différence du laboratoire de biologie clinique qui peut, et même doit appliquer ses techniques avec une grande souplesse selon les recherches à effectuer, le laboratoire de contrôle des produits destinés à être injectés cherche au contraire à utiliser des méthodes standard simples, précises, sûres et aussi économiques que possible.

Si tous les germes de souillure étaient aérobies, ce contrôle ne présenterait pas de difficultés. Mais il importe de déceler les germes anaérobies qui, aussi bien que les aérobies, peuvent contaminer l'échantillon expertisé. Or, l'examen en série de très nombreux lots n'est guère compatible avec la mise en œuvre des méthodes classiques de culture des germes anaérobies. On peut cependant les simplifier en utilisant des milieux qui permettent la culture dans le même tube sans précautions spéciales des germes aérobies et des germes anaérobies.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 juillet 1950.

Le moyen le plus simple d'y parvenir consiste à ajouter au milieu de culture un ou plusieurs corps capables d'en abaisser le potentiel d'oxydo-réduction. Plusieurs substances réductrices ont été effectivement expérimentées à cet effet. Citons seulement, parmi celles qui ont été retenues, les *sulfites alcalins* étudiés dès 1898 par Trenkmann [1], puis en 1920 par Ciani ; l'*acide pyruvique* par Berthelot [2] ; la *cystéine* par Hosoya Seigo [3], puis par Quastel et Stephenson [4] ; le *thioglycolate de soude* recommandé par le National Institute of Health américain [5, 6], le *thiomalate de sodium* essayé récemment [7], et la *réductose* préconisée par Prévot [8, 9]. Tous ces procédés simplifient singulièrement la culture des anaérobies.

Une technique satisfaisante de contrôle bactériologique de produits biologiques requiert néanmoins un certain nombre de conditions :

Il faut, en effet, que le milieu soit facile à préparer, que les éléments qui entrent dans sa composition se trouvent dans le commerce, qu'ils soient bon marché, et que leur combinaison dans le milieu élaboré permette le départ en culture *du plus grand nombre possible de germes aérobie et anaérobies* dans les conditions de température optima. Il faut aussi que ce milieu reste relativement stable dans le temps, qu'il conserve ses propriétés de façon durable, c'est-à-dire que son système réducteur lui permette de se régénérer dans la mesure où il se laisse oxyder par l'air ambiant. Il faut aussi que le réducteur employé ne modifie pas sensiblement en vieillissant l'aspect du milieu, ni ne gêne d'une façon ou d'une autre la culture des germes que l'on se propose de déceler.

Nous pensons que le milieu décrit ci-dessous, *milieu semi-liquide à base d'hydrosulfite de soude*, répond à ces *desiderata*. Ce milieu HS, comme nous l'avons appelé, est utilisé dans les laboratoires du Service Central de Transfusion-Réanimation de l'Armée depuis plus d'un an pour déceler les germes qui souillent certains lots de plasma, sang conservé, sérum de convalescent et autres produits biologiques d'origine sanguine. Il nous a paru supérieur à tous les autres milieux expérimentés, tels que le milieu américain au thioglycolate de soude, avec lequel il a été employé conjointement plusieurs milliers de fois.

Composition du milieu HS :

Bouillon peptoné	1.000 cm ³
Gélose	1,70 g.
Hydrosulfite de soude	3 g.
Glucose	5,50 g.
Solution à 1 p. 100 de bleu de méthylène	XIV gouttes.

Préparation du milieu HS : 1° Dissoudre la gélose par ébullition dans 500 cm³ de bouillon peptoné ;

2° Dissoudre l'hydrosulfite de soude et le glucose dans le reste du bouillon en chauffant légèrement ;

3° Mélanger les deux solutions dans un ballon et alcaliniser avec de la soude à 40 p. 100 de façon que le milieu terminé et stérilisé ait un pH voisin de 7,1 (mesuré à l'électrode de verre) ;

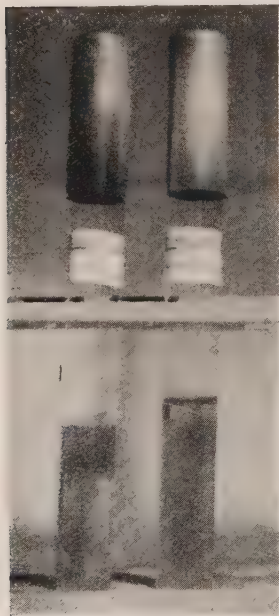
4° Chauffer le mélange à 80° C environ et filtrer le milieu chaud sur papier filtre mou humidifié (par exemple filtre Durieux n° 127) ;

5° Ajouter le bleu de méthylène. Comme la viscosité du milieu tend à gêner une distribution égale du bleu de méthylène dans le milieu, il est nécessaire d'agiter le ballon pendant une quinzaine de minutes pour bien assurer cette distribution ;

6° Répartir rapidement à raison de 15 à 20 cm³ environ de milieu par tube (tubes de 15 ou de 17 mm. de diamètre intérieur) et stériliser à l'autoclave pendant trente minutes à 110-115° C (température inférieure à celle atteinte lors de la préparation du bouillon) ;

7° Sortir de l'autoclave à chaud et refroidir brusquement les tubes en les plongeant dans de l'eau froide ;

8° Capuchonner et conserver à la température du laboratoire (20°-25° C), de préférence à l'obscurité.



Deux tubes de « milieu HS ». *A gauche*, culture de dix-huit heures d'un germe aérobic. *A droite*, culture de dix-huit heures d'un germe anaérobic.

Le milieu terminé se présente sous la forme d'un liquide visqueux, limpide, légèrement teinté en vert à la surface et au contact de celle-ci sur une hauteur de 0,8 cm. environ (zone oxydée), jaune clair ou ambré au-dessous (zone réduite). Par agitation, tout le milieu s'oxyde, ce qui s'objective par l'extension de la teinte verte au fond du tube.

Au repos, la réduction s'effectue d'elle-même et le milieu reprend en quelques minutes l'aspect qu'il a normalement avec ses deux zones distinctes.

CONSTITUANTS DU MILIEU HS. — 1° *Bouillon peptoné.* — Les meilleurs résultats sont obtenus avec un bouillon peptoné faiblement salé et récemment préparé de la façon suivante :

Macération à froid de 500 g. de viande dans 1.000 cm³ d'eau ; chauffage à petit feu pendant vingt minutes ; filtration sur linge mouillé ; addition au filtrat de peptone bactériologique, 15 g. et de

chlorure de sodium, 2,50 g. ; alcalinisation ; précipitation à l'autoclave à 125°-120° C ; filtration, stérilisation à 115°-120° C.

2° *Gélose*. — Nous utilisons de l'agar-agar ayant un taux d'humidité moyen de 16 p. 100. La gélose s'oppose dans une certaine mesure à l'entrée de l'air dans le milieu.

3° *Hydrosulfite de soude*. — C'est l'agent réducteur essentiel du milieu HS. Ce sel de formule $S_2O_4Na_2 \cdot 2H_2O$, se présente sous forme de cristaux qui se dissolvent bien dans le bouillon. Il n'est décomposé qu'à une température élevée, supérieure à celle de l'autoclave. Il n'altère pas la couleur, ni la transparence du bouillon auquel il est incorporé. Il tend, en revanche, à acidifier le milieu, ce que l'on corrige par une alcalinisation convenable. L'hydrosulfite de soude ne gêne nullement la culture des germes à déceler.

4° *Glucose*. — Ce sucre ajoute son action réductrice propre, signalée par Pasteur, à celle de l'hydrosulfite de soude.

5° *Bleu de méthylène*. — Ce colorant sert de réactif d'oxydo-réduction. Il prend en effet la forme *leuco*, réduite, pour un rH_2 inférieur à 14 dans les conditions d'équilibre acide-base du milieu. Il ne nous a pas paru au taux indiqué inhiber le départ en culture des germes de souillure.

pH. — Le pH final du milieu doit être de 7,1 ($\pm 0,1$). C'est à cette valeur que nous avons, pour la plupart des germes expérimentés, obtenu les meilleures cultures. Il n'est, par ailleurs, pas recommandé de tamponner le milieu au moyen de phosphates, car ceux-ci ont tendance à précipiter et à troubler le milieu HS aux doses qui seraient nécessaires. Ils rendent aussi plus difficile la préparation de ce milieu sous forme desséchée.

rH_2 . — CONSERVATION DU MILIEU HS. — Le potentiel d'oxydo-réduction du milieu HS fraîchement préparé est de l'ordre de 7,5 dans la zone anaérobie. Il ne varie pas pendant une dizaine de jours, alors que le rH_2 des milieux à base de thioglycolate de soude s'élève rapidement dès le troisième jour qui suit leur préparation. Des milieux HS préparés depuis cinq mois et non régénérés par ébullition ont un potentiel d'oxydo-réduction élevé de trois points seulement. Il est d'ailleurs facile de suivre à l'œil cette oxydation du fait de l'extension vers le fond du tube de la coloration verte qui révèle la zone oxydée. Celle-ci ne doit pas normalement avoir plus de 2 cm. de hauteur. Si elle s'étend à la moitié de la hauteur du milieu dans le tube, la culture des germes anaérobies stricts risque de ne pas avoir lieu. Mais il est possible de régénérer au moins une fois le milieu par ébullition prolongée au bain-marie.

EXPÉRIMENTATION.

Le milieu HS, étant essentiellement destiné à contrôler la stérilité des produits biologiques préparés, a été expérimenté de préférence avec les germes de souillure les plus courants :

De tels examens effectués pendant trois ans nous ont permis de reconnaître qu'il s'agit le plus souvent de cocci Gram + (entérocoques, staphylocoques), de bacilles diphtériniformes (*B. cutis commune*), de bacilles Gram + d'origine tellurique (*B. mycoïdes*, *B. megatherium*, *B. subtilis*) et de bacilles Gram — d'origine intestinale (colibacilles, paracolis, *Alcaligenes faecalis*). Occasionnellement, nous avons isolé des germes anaérobies, tels qu'un *Welchia perfringens*.

Nous avons comparé la culture des germes ci-dessous sur le milieu HS et sur des milieux divers, en particulier le milieu Difco au thioglycolate de sodium :

Enterococcus proteiformis, *Staphylococcus albus*, *Corynebacterium cutis*, *Corynebacterium diptheriae*, *Corynebacterium pseudodiphtericum*, *Bacillus mycoïdes*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus anthracoides*, *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Alcaligenes faecalis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella paratyphi B*, *Shigella paradysenteriae* var. *Flexneri*, *Shigella paradysenteriae* var. *Strong*, *Shigella schmitzii*, *Vibrio comma*, *Pasteurella pseudo-tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Welchia perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium aerofœtidum*, *Plectridium tetani* et trois autres germes anaérobies stricts du genre *Spherothorus*.

Les essais ont porté sur des milieux HS de vingt-quatre heures, de sept jours, de quatorze jours, de trente jours et de cent jours. Seuls ces derniers avaient été régénérés par ébullition au cinquantième jour.

Nous avons toujours obtenu dans les moindres délais des cultures abondantes. Quand il s'agissait de germes donnant des gaz en milieu glucosé, le dégagement de ces derniers était bien apparent. La culture des germes aérobies stricts est toujours restée limitée à la zone oxydée du milieu, tandis que les germes anaérobies stricts ne poussaient que dans la partie inférieure du tube privée d'oxygène.

Il convient de noter que toutes les souches essayées cultivaient de façon semblable en milieu HS et en milieu au thioglycolate, tandis que certains germes aérobies (*B. anthracoides*, *B. subtilis*, *Alcaligenes faecalis*, *C. pseudo-diphtericum*, vibron cholérique) poussaient nettement mieux en milieu HS qu'en milieu témoin au thioglycolate.

La morphologie des germes n'était pas sensiblement modifiée.

ni leur mobilité, ni leur sporulation. Enfin, leur vitalité persistait bien dans les délais normaux. Nous conservons effectivement nos souches de germes anaérobies sur ce milieu.

APPLICATIONS.

Le milieu HS convient bien *aux contrôles de stérilité des produits biologiques*. Il suffit d'ensemencer au moins deux tubes de milieu avec 3 à 4 cm³ du produit à éprouver. Un des tubes est mis à l'étuve à 37° C, le deuxième à 31° C (pour la culture des germes sensibles à la chaleur tels que les *Pseudomonas*). Après incubation, on peut, d'un coup d'œil, reconnaître si le produit expertisé était stérile ou s'il était souillé. S'il était stérile, le milieu de culture reste limpide. Si, au contraire, un trouble est constaté dans l'une des deux zones (germe aérobie ou anaérobie strict), ou dans l'ensemble du milieu (germe mixte), on sait immédiatement que le produit ensemencé était contaminé. Pour identifier l'agent de la souillure en cause, il n'y a plus qu'à recourir aux méthodes classiques après repiquage en milieu convenable.

Le milieu HS peut aussi être utilisé *en bactériologie courante* pour les hémocultures et l'examen bactériologique des diverses sécrétions et liquides de ponction. Il permet, en effet, la culture de germes qui ne cultivent pas ou cultivent difficilement sur les milieux usuels. On peut d'ailleurs l'enrichir par addition de facteurs de croissance (extrait globulaire, ascite-sérum, sang, etc.). Le glucose qu'il contient fait connaître sans retard la fermentation de ce sucre. Enfin l'hydrosulfite de soude qu'il renferme neutralise éventuellement les sulfamides et dispense de l'emploi d'acide para-amino-benzoïque.

CONCLUSION.

Un milieu semi-liquide à base d'hydrosulfite de soude est proposé pour le contrôle de la stérilité des produits biologiques. Ce milieu réalise les conditions nécessaires à la culture dans le même tube des germes aérobies et des germes anaérobies. Il possède en effet un pouvoir d'oxydo-réduction suffisant pour permettre le départ en culture de la plupart des germes anaérobies tout en permettant dans sa zone oxydée la culture des aérobies. Il est facile à préparer avec des produits courants, conserve ses qualités de façon durable, et simplifie la pratique de recherches bactériologiques jusque-là difficiles à exécuter.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] TRENMANN. *Centralbl. Bakt.*, 1898, **23**, 1038.
- [2] A. BERTHELOT. *C. R. Acad. Sci.*, 1923, **176**, 1929.

- [3] HOSOYA SEIGO. *Tokyo Imp. Univ. Sc. Rep. Gov. Inst. for Infect.*, 1926, **123**.
- [4] QUASTEL et STEPHENSON. *Biochem. J.*, 1926, **20**, 1126.
- [5] J. H. BREWER. *J. Bact.*, 1940, **39**, 10.
- [6] M. PITTMAN. *J. Bact.*, 1946, **51**, 19.
- [7] P. SEDALLIAN, R. MARAL, M. CARRAZ, M. ARCHINET et P. DETOLLE. *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 1090.
- [8] A.-R. PRÉVOT. *Ces Annales*, 1948, **75**, 77.
- [9] A.-R. PRÉVOT et M. MOUREAU. *Ann. Biol. Clin.*, 1949, **7**, 353.

PREPARATION DE LYSATS BACTERIOPHAGIQUES DE TITRE ÉLEVÉ. PURIFICATION ET CONCENTRATION DES PHAGES PAR DEUX ADSORPTIONS SUCCESSIVES SUR PHOSPHATE DE CALCIUM

par R. WAHL, A. TERRADE et G. MONCEAUX (*).

(Institut Pasteur.)

Dans beaucoup de cas, il est nécessaire de disposer de préparations de phages purifiées d'un titre élevé.

En soumettant successivement des lysats en milieu synthétique à l'adsorption sur phosphate de calcium (R. Wahl, P. Grabar, M. Rouyer et L. Blum-Emerique) [2] et à la précipitation par l'éthanol à basse température (R. Wahl et L. Blum-Emerique) [3], on peut obtenir des préparations purifiées et concentrées du phage C₁₆ sur *Shigella paradyenteriae*.

Mais nous avons constaté que cette méthode présente des inconvénients avec certains lysats, notamment avec ceux de *Salmonella enteritidis*, var. Danysz. En particulier, on concentre dans ces cas l'endotoxine de Boivin [5]. C'est pourquoi nous avons mis au point une nouvelle méthode assez différente de la première.

Les essais ont été faits avec les phages D4, T5, D5 et diverses souches de la var. Danysz (1). Les phages étaient titrés par la méthode des plages après dilutions dans du liquide de Ringer ; le nombre de bactériesensemencées était évalué avec une approximation suffisante par comparaison avec des suspensions étalons, qui avaient été formolées après numération des bactéries par la méthode des colonies sur gélose.

PRÉPARATION DES LYSATS.

Le milieu de culture utilisé dans la première méthode a été adapté à la multiplication des phages étudiés dans le présent

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 juillet 1950.

(1) Ces souches et ces phages seront étudiés dans une publication ultérieure.

travail. L'addition de CaCl_2 , d'hydrolysate de caséine et de tryptophane permet d'obtenir avec ceux-ci des titres élevés. La nouvelle composition du milieu a rendu nécessaire la stérilisation séparée de certains de ces éléments.

On prépare les solutions suivantes :

A. — 1° KCl : 0,50 g. ; $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$: 0,75 g. ; $\text{SO}_4\text{Mg } 7\text{H}_2\text{O}$: 0,05 g. ; acide nicotinique : 0,01 g. ; eau bidistillée : pour compléter à 100 cm^3 .

B. — 2° $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H } 12\text{H}_2\text{O}$: 19,95 g. ; PO_4KH_2 : 0,45 g. ; eau bidistillée : pour compléter à 100 cm^3 .

C. — 3° Solution de glucose à 30 p. 100.

D. — 4° Solution de CaCl_2 à 0,4 p. 100.

E. — 5° Hydrolysate acide de caséine préparé d'après la technique de Gladstone et Fildes [1] et dilué (7,5 cm^3 d'hydrolysate pour 180 cm^3 d'eau bidistillée).

F. — 6° Solution de tryptophane M/40.

Chaque solution est stérilisée séparément à l'autoclave, puis on les mélange dans les proportions suivantes :

100 cm^3 de A, 7,5 cm^3 de la solution de glucose, 10 cm^3 de la solution de phosphates, 1 cm^3 de la solution de CaCl_2 , 3 cm^3 de la solution de tryptophane.

Notons que le rendement en phages était moins bon en remplaçant l'hydrolysate de caséine par un mélange de 18 acides aminés et que l'addition d'eau de levure, de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, de Cl_2Mn à notre milieu ne l'a pas amélioré.

Les cultures sont placées au bain-marie à 37° dans un appareil à agitation.

Les proportions optima de bactéries, de phages ont été déterminées par des expériences préalables. Onensemence environ 3×10^8 bactéries par centimètre cube de milieu ; ce qui correspond à peu près à une culture de dix-huit heures sur tube de gélose inclinée (eau peptonée gélosée à 2,3 p. 100), émulsionnée dans 100 cm^3 de milieu. Après une heure d'agitation au bain-marie on introduit 10^5 phages par centimètre cube. A partir de la quatrième heure qui suit l'introduction du phage, la culture est examinée tous les quarts d'heure. Dès qu'elle s'éclaircit nettement, elle est mise à la glacière où la lyse progresse encore. Si l'opacité augmente continuellement, la culture est mise à la glacière au bout de cinq heures. On n'observe pas habituellement, dans ces conditions, une lyse totale. En général il persiste des ondes moirées (dues à des bactéries non lysées) et des débris bactériens agglutinés. La présence de ceux-ci indique à elle seule qu'une lyse notable s'est produite.

On élimine la plupart des bactéries non lysées et les débris bactériens par une centrifugation à 4.000 tours/minute pendant dix minutes. On obtient ainsi des lysats titrant en général de

$1,5 \times 10^{10}$ à 6×10^{10} phages par centimètre cube. On élimine les lysats dont le titre est plus faible.

STÉRILISATION DES LYSATS.

Les lysats contiennent encore des bactéries vivantes (sensibles et résistantes) et des débris bactériens. Si on désire les conserver tels quels, il faut les stériliser en y introduisant un cristal de thymol [4] et en laissant en contact à la glacière pendant cinq à six jours, ou bien les filtrer sur bougie L3 sous faible dépression (20 cm. de Hg au plus) après alcalinisation à pH 8 environ par le carbonate de sodium. Nous avons constaté, en effet, que dans ces conditions le titre ne diminue pas, alors que la filtration à un pH plus bas fait baisser le titre, sans doute par adsorption des phages sur la bougie.

Si on procède à la purification, la stérilisation est inutile ; les quelques bactéries qui subsistent sont adsorbées sur le phosphate de calcium. Mais il est bon, pendant les opérations et en particulier la dialyse, de placer un cristal de thymol dans chaque fraction.

COURBE D'ADSORPTION DES PHAGES EN FONCTION DU pH.

R. Wahl, P. Grabar, M. Rouyer et L. Blum-Emerique ont montré que l'adsorption du phage C_{16} sur phosphate de calcium ne se fait qu'au-dessous de pH 5,8.

Nous avons étudié systématiquement l'adsorption du phage D4, sur des précipités de phosphate de calcium, formés dans le lysat par addition de diverses quantités d'une solution à 4 p. 100 de $\text{CaCl}_2 + 4\text{H}_2\text{O}$. On a procédé de deux façons différentes, soit en ajoutant à des volumes égaux de lysat divers volumes de la solution de chlorure de calcium, soit en versant celle-ci par portions successives dans un volume déterminé de lysat. Dans les deux cas, après chaque addition de solution de chlorure de calcium, on mesurait le pH et on titrait les phages du liquide, après centrifugation.

Les lysats utilisés étaient à des pH très différents, de 6,9 à 7,5. Certains avaient été alcalinisés préalablement par du CO_3Na_2 , jusqu'à pH 7,8. On a constaté que l'adsorption des phages n'était influencée ni par ces conditions initiales différentes, ni par le mode d'introduction du chlorure de calcium.

Par contre, l'adsorption est fonction du pH auquel le phosphate de calcium est précipité. Sans entrer dans le détail de ces expériences, nous en donnerons les résultats d'ensemble :

Aucun phage n'est adsorbé au-dessus de pH 6,3.

La presque totalité des phages est adsorbée entre pH 6,3 et pH 5,3.

Bien qu'il y ait d'assez notables différences suivant les cas, on peut considérer que, en fonction du pH auquel les phages ont été adsorbés sur le précipité, le reliquat de phages non adsorbés qu'on retrouve dans le surnageant est en moyenne de :

1/500	Pour une adsorption faite à pH 6,15.
Entre 1/500 et 1/1.000	— — à pH 6 ou 5,9.
1/1.000	— — à pH 5,8.
1/5.000-1/10.000	— — à pH 5,6.
1/100.000	— — à pH 5,3.

On voit qu'il n'y a pas grand intérêt à descendre au-dessous de pH 5,3, d'autant plus qu'une inactivation partielle serait alors possible. La concentration des phages dans le lysat influe peu sur le taux de l'adsorption. Nous avons fait des essais avec des lysats de titres très différents (de 3×10^8 à 6×10^{10} phages par centimètre cube). Le pourcentage des phages adsorbés à un pH donné différerait peu pour des lysats de titres différents. Il est cependant un peu moindre pour les titres élevés, mais dans ce cas le nombre absolu des phages adsorbés est tellement plus grand, que cette différence est négligeable.

La méthode que nous allons décrire est basée sur le rôle du pH dans l'adsorption des phages. Une première adsorption à pH 7,30 élimine des protéides bactériens et laisse les phages en solution ; les phages sont ensuite adsorbés entre pH 5,4 et 5,3, puis élués.

Des essais préalables ont permis de régler les détails techniques. Nous en donnerons simplement les résultats :

1° Pour obtenir une bonne adsorption des protéides bactériens il est utile d'ajouter au lysat, avant toute précipitation, une certaine quantité de phosphates alcalins, pour augmenter le volume du précipité, et pour élever le pH aux environs de 7,5. Cette précaution était inutile dans le cas du phage C₁₆, où cette précipitation, faite à pH 5,8, intéressait la presque totalité des phosphates du milieu.

2° Après cette première adsorption, nous avons essayé de précipiter les phosphates restant en solution, en ajoutant directement dans le surnageant une nouvelle quantité de la solution de chlorure de calcium. Mais l'adsorption des phages sur le petit précipité ainsi obtenu était irrégulière.

Nous avons, au contraire, obtenu de bons résultats en ajoutant au surnageant du phosphate de calcium préparé à l'avance par précipitation séparée.

3° La quantité de phosphate de calcium ainsi ajoutée doit être assez grande pour que l'adsorption soit complète, mais elle ne doit pas être trop grande pour que l'éluion soit praticable avec de petits volumes de liquide, pour permettre de concentrer les phages.

4° On a essayé, comme éluants, diverses solutions salines ; NaCl, KCl ou SO_4Mg à 1 p. 100 ; CO_3Na_2 à 1 p. 100 et à 3 p. 100. Mais seules les solutions de phosphates alcalins à pH 7,6 nous ont donné des éluions pratiquement totales des phages. La solution concentrée de phosphates qui a servi à la préparation du milieu a donné de bons résultats, employée à volume égal au volume initial. Le même volume d'une dilution au demi ou au quart de la même solution a donné d'aussi bons résultats. Mais l'éluion était moins bonne quand elle était diluée au 1/10.

L'expérience a montré que la dilution au quart convient le mieux pour les éluions avec des volumes inférieurs au volume initial.

MÉTHODE DE PURIFICATION ET DE CONCENTRATION.

On utilise la solution concentrée de phosphates alcalins à pH 7,6 qui a servi à la préparation du milieu et une solution de $\text{CaCl}_2 + 4 \text{H}_2\text{O}$ à 4 p. 100.

La première contient 54 g. d'ions PO_4^{4-} par litre ; elle est environ 0,57 M ; la seconde est environ 0,22 M.

Il faut théoriquement 3,9 cm^3 de la solution de chlorure de calcium pour saturer 1 cm^3 de la solution de phosphate.

La méthode est applicable à des quantités quelconques de lysat. Nous la décrirons pour 200 cm^3 . Elle comprend trois temps : adsorption des protéides bactériens, adsorption des phages, éluion.

Adsorption des protéides bactériens.

200 cm^3 de lysat centrifugé sont additionnés de 34 cm^3 de la solution concentrée de phosphates et placés dans l'eau glacée. On mesure 60 cm^3 de la solution de chlorure de calcium qui sont portés également à la température de la glace fondante et ajoutés au lysat par petites portions et en agitant. Le pH est contrôlé en cours d'opération. Il ne doit pas descendre au-dessous de 6,30.

Après dix minutes de repos à la même température, le précipité s'est rassemblé au fond. On prend le pH du surnageant. S'il est supérieur à 6,30 on ajoute de nouvelles quantités de la solution de chlorure de calcium, par portions de 2 cm^3 par exemple. Le pH doit être finalement très voisin de 6,30. On centrifuge, et on rejette le surnageant.

Adsorption des phages.

On a préparé un précipité de phosphates, en mélangeant dans un tube à centrifuger :

20 cm³ d'eau bidistillée ;

8,7 cm³ de la solution concentrée de phosphates ;

18 cm³ de la solution de chlorure de calcium.

Le précipité est centrifugé, lavé avec 20 cm³ d'eau bidistillée et centrifugé à nouveau. L'eau de lavage est rejetée et remplacée par le lysat ayant subi le traitement précédent.

Après remise en suspension du précipité, on ajoute 19 cm³ de la solution de calcium, on agite doucement à la glacière pendant dix minutes, on centrifuge et on prend le pH du surnageant. Il doit être compris entre 5,40 et 5,30. S'il est au-dessus de 5,40, on ajoute une nouvelle quantité de la solution de chlorure de calcium par portions de 1 cm³ jusqu'à l'obtention du pH voulu. On centrifuge, on titre les phages dans le surnageant et on rejette celui-ci.

Elution.

La solution de phosphates est diluée au quart. On élue par exemple avec 30 cm³ de cette solution diluée, en agitant de la même façon que pour l'adsorption. L'éluat peut être dialysé.

Suivant le volume d'éluant utilisé, on peut obtenir des solutions six à huit fois plus concentrées en phages que le lysat initial et dans lesquels le rapport $\frac{N \text{ protéides}}{\text{Nb de phages}}$ est très sensiblement inférieur à sa valeur initiale.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1° Des lysats bactériophagiques de titre très élevé ont été obtenus avec divers phages actifs sur *Salmonella enteritidis*, var. Danysz, en utilisant un milieu semi-synthétique à l'hydrolysate de caséine, et en ensemençant avec des proportions déterminées de phages et de bactéries.

2° Si l'on pratique la filtration sur bougie, le pH doit être ajusté à 8 environ pour éviter l'adsorption des phages sur la bougie.

3° Les lysats sont traités par deux adsorptions sur phosphate de calcium. La première, à pH 6,30, laisse les phages en solution. La seconde, à pH 5,30, adsorbe les phages. Ceux-ci sont élués par une solution de phosphates alcalins à pH 7,6. En utilisant un volume d'éluant inférieur au volume initial, on obtient finalement une concentration des phages de l'ordre de 5×10^{11} par centimètre cube et une purification notable.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GLADSTONE (G. P.) et FILDES (P.). *Brit. J. exp. Path.*, 1940, **21**, 161.
- [2] WAHL (R.), GRABAR (P.), ROUYER (M.) et BLUM-EMERIQUE (L.). *Ces Annales*, 1946, **72**, 682.
- [3] WAHL (R.) et BLUM-EMERIQUE (L.). *Ces Annales*, 1949, **76**, 103.
- [4] WAHL (R.) et BLUM-EMERIQUE (L.). *Ces Annales*, 1949, **77**, 561.
- [5] WAHL (R.) et TERRADE (A.). *Ces Annales*, 1950, **79** (sous presse).

ANTIBIOTIQUES ET LYSÉ BACTÉRIOPHAGIQUE

VII. — L'ACTION ANTIPHAGE DE LA CHLOROMYCÉTINE

par E. EDLINGER et M. FAGUET (*).

(Institut Pasteur. Service du Bactériophage.)

Dans la note précédente [1], nous avons montré que l'action de la chloromycétine sur la culture du staphylocoque blanc Twort est relativement faible : la courbe de croissance de ce germe est légèrement retardée et, d'autre part, il se produit, après qu'elle a atteint son maximum, une diminution lente et continue de l'opacité de la culture (bactériolyse chloromycétinique).

Au contraire, si on ajoute la chloromycétine à la culture en même temps que le phage, la lyse phagique est inhibée et la présence du phage n'est marquée que par une légère accélération de la bactériolyse chloromycétinique.

Dans le présent travail nous avons voulu suivre la succession des phénomènes qui se produisent lorsque la chloromycétine est ajoutée avant ou après l'introduction du phage à des intervalles de temps variés. En outre, pour essayer d'élucider la relation hôte-phage, nous avons procédé à l'étude de la multiplication du phage sous l'influence de la chloromycétine.

Technique : Dans la note précédente nous avons indiqué la technique employée pour l'étude au microbiophotomètre. Comme auparavant, nous avons ensemencé les six cuves du microbiophotomètre, contenant 20 cm³ d'eau peptonée, avec $1-2.10^6$ germes d'une culture de staphylocoque blanc Twort. Le titre du bactériophage homologue était, au moment de l'introduction, 2.10^7 particules par centimètre cube.

La chloromycétine (chloramphénicol) provenait d'une solution-mère de 25 mg., diluée dans l'eau bidistillée jusqu'aux dilutions nécessaires à nos essais.

La première figure réunit les expériences dans lesquelles 50 µg de chloromycétine par centimètre cube étaient ajoutés à différents moments de la croissance bactérienne, tandis que le phage était toujours ajouté au même moment, c'est-à-dire au milieu de la phase exponentielle.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 juillet 1950.

Les courbes-témoins montrent la croissance normale de la culture et la lyse bactériophagique avec son allure brusque, totale ou durable, survenue environ deux heures après l'introduction du phage.

Si on ajoute l'antibiotique pendant la phase de latence (courbe 1) la culture ne se développe que faiblement pour revenir bientôt à sa densité initiale. La courbe 2 montre l'intervention de la chloromycétine au début de la phase exponentielle : la croissance est très ralentie en comparaison de la croissance du témoin, mais la diminution d'opacité consécutive est beaucoup plus faible que celle des courbes 3 et 4 où la chloromycétine est ajoutée respectivement quinze à quarante-cinq minutes après le phage. Ces deux courbes montrent un aspect semblable à celui

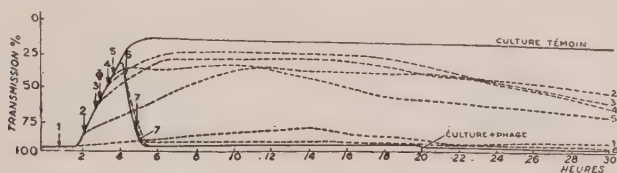


Fig. 4. — Action de 50 γ de chloromycétine à différents moments de la lyse bactériophagique. Ψ , intervention; φ , 2.10^7 particules de phages par centimètre cube; 1 à 7, 50 γ de chloromycétine par centimètre cube.

que nous avons vu dans la note antérieure, lorsque la même dose d'antibiotique est ajoutée en même temps que le phage : la croissance est ralentie et n'atteint pas le niveau du témoin de croissance ; ce niveau est suivi d'une diminution d'opacité lente et continue.

Mais si la chloromycétine est ajoutée un peu avant le moment où la lyse devrait commencer (courbe 5), le retard de la croissance est très important et après un temps relativement court, la courbe prend l'aspect d'une lyse très ralentie et incomplète.

La même dose d'antibiotique ne change pas d'une façon significative l'aspect de la lyse normale, lorsque celle-ci est amorcée (courbes 6 et 7).

Dans la figure 2 sont réunies des expériences semblables, mais avec 12,5 μg ou 250 μg de chloromycétine par centimètre cube.

L'aspect des courbes des cultures auxquelles on a ajouté la faible dose d'antibiotique (courbes 1 à 5), est assez semblable à celui des courbes correspondantes de la figure 1 qui montrent des cultures soumises à l'action de 50 μg de chloromycétine. Toutefois la croissance est plus développée et la lyse différée de la courbe 3 est un peu plus accentuée.

250 μg de chloromycétine ajoutés trente minutes après l'introduction du phage provoquent un ralentissement considérable de la croissance, bientôt suivie d'une diminution d'opacité (courbe 1).

Si on ajoute la même dose pendant la lyse (courbe 2) celle-ci continue un certain temps, puis elle s'arrête et laisse la place à une lente augmentation du nombre de germes.

Afin de chercher si la chloromycétine laissée en contact avec le filtrat bactériophagique ne diminue pas le nombre de corpuscules et montre ainsi son pouvoir antiphagique, nous avons entrepris des essais dans lesquels la chloromycétine était laissée à diverses concentrations (de 50 à 2.500 μg par centimètre cube) en contact avec le filtrat bactériophagique, soit à la température du laboratoire, soit à 37° C. Après différents temps, un titrage du

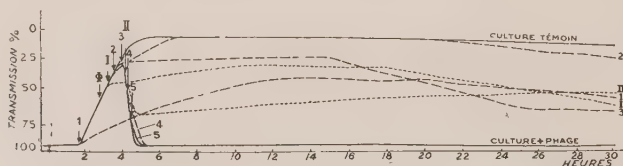


Fig. 2. — Action de diverses doses de chloromycétine ajoutées à différents moments de la lyse phagique. Ψ , intervention; ϕ , 2.10^7 particules de phages par centimètre cube; I, II, 250 γ ; 1 à 5, 12,5 γ de chloromycétine par centimètre cube.

filtrat bactériophagique sur une culture sur boîte de gélose était effectué.

Les résultats ont montré que le titre du filtrat phagique mis en contact avec 2.500 μg de chloromycétine pendant cinq jours n'a pas montré de variation significative du titre du filtrat phagique-témoin. Nous avons obtenu un résultat identique avec des concentrations plus faibles d'antibiotique et un contact plus court.

Pour étudier la multiplication du phage dans une culture additionnée de chloromycétine, nous avons utilisé la technique suivante : dans les expériences qui correspondent à la figure 1 (c'est-à-dire dans lesquelles on ajoute 50 μg de chloromycétine à divers moments de la croissance bactérienne et le phage au milieu de la phase exponentielle) et aux courbes 1 et 2 de la figure 2 (c'est-à-dire 250 μg de l'antibiotique par centimètre cube, quinze minutes après le phage ou pendant la lyse, on prélève 0,1 cm^3 de la culture de temps en temps. On effectue la numération des plages obtenues par étalement de la dilution convenable de la culture sur une boîte de gélose préalablement ensemencée avec une suspension dense de bactéries. Les résultats sont réunis dans la figure 3.

Pour la culture-témoin, le titre du phage monte rapidement pendant deux heures puis, après une augmentation plus lente, reste stable à environ $8 \cdot 10^9$.

Si on ajoute, comme dans la courbe 1, l'antibiotique deux heures avant le phage, toujours dans la phase de latence, le nombre des corpuscules, après une diminution de $2 \cdot 10^7$ à $5 \cdot 10^6$, se maintient assez constant. Au contraire, si on ajoute la chloromycétine une heure avant le phage, la chute au cours de la première demi-heure atteint la valeur de $4 \cdot 10^5$; ensuite, elle prend

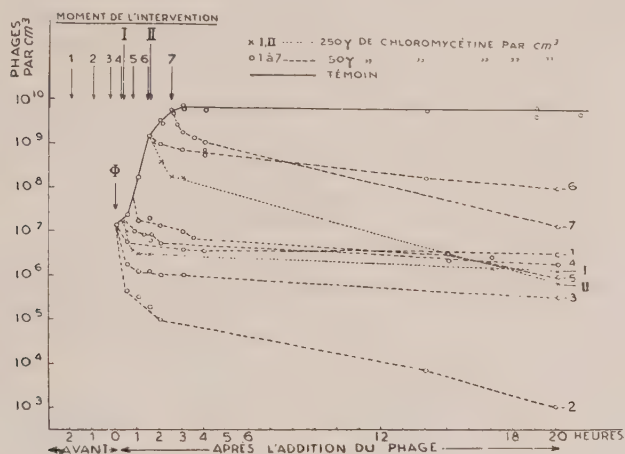


FIG. 3. — Multiplication du phage dans une culture bactérienne sous l'influence de la chloromycétine.

une allure continue mais moins brusque pendant toute l'expérience. Après vingt heures, le titre est de $1 \cdot 10^3$.

L'introduction de l'antibiotique quinze minutes avant ou quarante-cinq minutes après le phage (courbes 3, 4, 5) provoque chaque fois une baisse accélérée du titre dès la première heure. Cette baisse est d'autant plus rapide que le titre était plus élevé auparavant.

Par la suite, la diminution du titre continue, mais d'une façon plus modérée.

L'aspect de la courbe 6 qui montre les titres en phage, lorsque l'intervention de l'antibiotique est effectuée une heure et demie après l'introduction du phage, est assez semblable. Enfin, l'introduction de la chloromycétine pendant la lyse phagique (courbe 7) montre une diminution beaucoup plus grande pendant tout le temps de l'expérience que les courbes précédentes : le titre descend de $6 \cdot 10^9$ à $2 \cdot 10^7$, donc une diminution de deux cents fois.

Si on ajoute 250 μg de chloromycétine vingt minutes après le phage (courbe 1), l'aspect de la courbe est assez semblable à celui des courbes qui correspondent à l'addition simultanée du phage et de l'antibiotique à la dose la plus faible. L'introduction de la dose élevée pendant la lyse (courbe 2) provoque, elle aussi, une forte diminution pendant tout le temps de l'expérience, comparable à celle qui se manifeste lorsqu'on introduit 50 μg , mais elle est encore plus étendue à la fin de l'expérience, le titre est descendu à 1.10^3 du titre initial.

Discussion : La chloromycétine ajoutée à une culture pendant la phase de latence ou pendant la phase exponentielle empêche la lyse phagique, si le phage est ajouté au milieu de la phase exponentielle. Si l'intervention de l'antibiotique est faite juste avant le moment où la lyse devrait commencer, cette lyse est différée et incomplète. L'introduction de la chloromycétine pendant la lyse phagique laisse cette lyse inchangée, si la dose de l'antibiotique est 50 μg par centimètre cube ; par contre, si la dose est 250 μg , cette lyse, après une certaine continuation s'arrête et on constate une nouvelle croissance.

Dans les conditions de nos expériences un contact prolongé des fortes doses de l'antibiotique avec un lysat phagique est sans effet sur le titre du lysat. Par contre, les titrages des cultures infectées avec le phage montrent une diminution forte du titre. Il convient de faire remarquer que nous avons effectué une numération des plages de la culture, c'est-à-dire des « centres infectieux », dont certains peuvent être produits par un phage libre, d'autres par une cellule bactérienne infectée. Cette diminution est au début très forte. La plus grande diminution se voit dans les cas où l'antibiotique est ajouté dès le début de la phase exponentielle ou pendant la lyse ; c'est-à-dire chaque fois que l'intervention est assez éloignée de l'introduction du phage. Dans ces deux cas, la diminution ultérieure est aussi plus forte que dans les autres expériences.

Relativement moins forte est la diminution, lorsque les temps d'introduction du phage et de l'antibiotique sont plus rapprochés. La plus faible diminution du titre survient, si l'antibiotique est ajouté pendant la phase de latence, où l'action de l'antibiotique ne permet qu'une faible densité bactérienne.

Dans certaines conditions, enfin, l'antibiotique n'empêche pas la lyse, mais il y a aussi une diminution du titre en phages.

Déjà, J. J. Bronfenbrenner [2, 3] a admis que la lyse des bactéries contaminées par le bactériophage est un processus d'autolyse bactérienne et que la lyse phagique ne représente pas en soi une partie intégrante de la multiplication du phage. Le phage ressemble à une sorte de catalyseur de la lyse et la multiplication n'y est pas nécessaire.

On pourrait penser que la chloromycétine à doses moyennes agit de telle façon sur le phage qu'il exerce encore son pouvoir d'entraîner la lyse sans pouvoir se multiplier. Des recherches ultérieures seront nécessaires pour savoir si cette supposition se vérifie.

La diminution du titre phagique en présence seulement de cellules bactériennes peut recevoir dans l'état actuel de nos recherches plusieurs interprétations hypothétiques :

1° La chloromycétine agirait sur la cellule bactérienne de telle façon que cette dernière deviendrait inapte à la multiplication du phage. La destruction par l'antibiotique de cellules contenant le phage fixé entraîne la diminution des « centres infectieux ».

La chloromycétine agirait donc sur la bactérie autrement que la pénicilline qui permet, selon Price [4], une multiplication du phage en dépit de la bactériostase provoquée par cet antibiotique. La chloromycétine doit avoir un autre mode d'action que la streptomycine. L'un de nous (Edlinger) [5] a montré récemment que la multiplication du phage est possible en présence de streptomycine, si la culture est devenue streptomycino-résistante.

2° La chloromycétine agit directement sur le phage déjà libéré par la cellule.

3° La chloromycétine agit sur le phage en voie de multiplication sur ou dans la cellule bactérienne.

L'antibiotique n'empêche pas seulement la multiplication du phage, mais diminue aussi le nombre des « centres infectieux ».

La bactériolyse chloromycétinique peut être responsable, au moins pour une part, de la diminution par la destruction de cellules contenant les phages fixés. Mais l'antibiotique pourrait aussi agir de telle façon qu'il empêche le métabolisme d'un facteur nécessaire pour le phage, tandis que la cellule bactérienne est moins dépendante du même facteur.

La deuxième interprétation nous semble la moins vraisemblable, parce qu'ainsi l'antibiotique aurait une action plus prononcée sur un lysat phagique. Sans pouvoir écarter totalement la première hypothèse de l'action antibactérienne de l'antibiotique, nous penchons plutôt pour la dernière supposition. La faible diminution du titre des phages dans une culture en faible croissance et l'interruption de la lyse bactérienne par une très forte concentration de la chloromycétine parlent surtout en faveur d'une attaque du phage lorsque celui-ci est combiné à la cellule bactérienne.

S'il est permis de faire un rapprochement entre le bactériophage et les virus du groupe lymphogranulomatoso-psittacoso, les observations de Maurin et Barski [6] montrent une action semblable de la chloromycétine sur ces virus. L'antibiotique n'atténue que très légèrement le pouvoir pathogène d'une suspension de ces virus, mais il attaque les virus en multiplication sur les cellules.

Résumé : Les observations au microbiophotomètre et les titrages du phage dans les cultures staphylococciques auxquelles on ajoute différentes doses de chloromycétine avant ou après l'introduction du phage Twort montrent que l'intervention de l'antibiotique jusqu'au commencement de la lyse empêche toujours celle-ci ; les doses faibles et moyennes de chloromycétine permettent la lyse, si elles sont ajoutées pendant la lyse, tandis qu'une forte dose peut arrêter la lyse bactérienne.

Sans posséder une action anti-phage directe sur un lysat phagique, la chloromycétine diminue toujours le titre phagique d'une culture bactérienne infectée avec le phage. On émet l'hypothèse d'une action de l'antibiotique contre le phage en multiplication sur ou dans la cellule bactérienne.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. FAGUET et E. EDLINGER. *Soc. Franç. Microbiol.*, 1950, séance du 6 juillet.
- [2] J. J. BRONFENBRENNER. *Am. J. Path.*, 1927, **3**, 563.
- [3] J. J. BRONFENBRENNER. *Proceed. Soc. exp. Biol. & Med.*, 1927-1928, **25**, 480.
- [4] W. H. PRICE. *J. gen. Phys.*, 1947-1948, **31**, 119.
- [5] E. EDLINGER. *Soc. Franç. Microbiol.*, 1950, séance du 1^{er} juin.
- [6] G. BARSZI et J. MAURIN. *Ces Annales*, 1950, **78**, 789.

ETUDE SUR LA GELIFICATION DES PROTÉINES

II. — ACTION DES ALCOOLS SUR LA GÉLIFICATION DE LA CASÉINE

par COLETTE MAGIS.

(Institut Pasteur. Laboratoire de Chimie biologique.)

Dans une publication antérieure, nous avons étudié l'action des bases et acides forts sur la formation des gels de caséine [1]. Nous avons ainsi pu établir un diagramme de gélification en fonction du pH et de la température et nous avons montré que ce diagramme présentait de grandes analogies avec ceux établis par Barbu et Machebœuf [2, 3] pour les protéines sériques et en particulier les globulines. Néanmoins, la caséine, proche des globulines par certaines propriétés, présentait un diagramme avec des différences caractéristiques et ceci nous avait amenée à confirmer que ces diagrammes pourraient, dans une certaine mesure, servir à la caractérisation des différentes protéines.

Barbu et Machebœuf [4] ont également étudié l'action des alcools aliphatiques sur la formation des gels de protéines sériques. Nous avons voulu étudier si ces mêmes alcools avaient une action analogue sur les gels de caséine.

Nous avons constaté que, comme dans le cas des protéines sériques, les alcools favorisaient la formation des gels de caséine, mais dans des conditions un peu différentes que pour les protéines sériques. Les alcools accélèrent la formation des gels de caséine dans les zones de pH où ils se forment en l'absence de ces alcools, mais, de plus, il apparaît des gels dans des zones de pH où, en leur absence, ils ne se forment pas : 1° entre pH 3 et pH 4 et 2° dans la zone alcaline comprise entre pH 9 et pH 12.

Par contre, l'addition d'alcool aux solutions de caséine ayant une alcalinité comprise entre pH 13 et une concentration en alcali 3 M empêche la formation des gels, si l'alcool est ajouté avant la formation de ceux-ci et il les détruit si ceux-ci sont déjà formés. Les alcools élargissent donc la zone de gélification acide et déplacent la zone de gélification alcaline.

L'addition d'alcool a aussi pour effet d'élargir la zone de précipitation autour de l'isoélectrique.

PROTOCOLE DES EXPÉRIENCES.

La caséine est préparée selon la technique décrite dans notre précédente publication [4].

ACTION DE L'ÉTHANOL EN FONCTION DU pH. — On prépare plusieurs séries de tubes contenant chacun un même volume de solution de caséine à 16 p. 100 et dont les pH sont échelonnés entre 1 et 13. Les alcalinités supérieures sont exprimées en molarité d'alcali. Ces solutions de caséine sont refroidies à 0° C et additionnées d'un égal volume d'un mélange d'éthanol et d'eau de titre connu. Ce mélange alcoolique est également refroidi à 0° C : ceci évite la dénaturation de la protéine sous l'action de l'alcool au moment du mélange. On laisse ensuite la température revenir à 20° C. La concentration finale en caséine est de 8 p. 100, la concentration alcoolique est de 10, 20, 30 et 40 p. 100. On garde les solutions dans des tubes bouchés et on observe les changements d'état en fonction du temps.

1° *Entre pH 1 et pH 3.* — L'addition d'éthanol n'a guère d'influence sur la formation du gel. Tout au plus peut-on noter une légère accélération dans la gélification et une moindre fusibilité si on chauffe le gel au bain-marie quand la concentration alcoolique est égale ou supérieure à 20 p. 100.

2° *Entre pH 3 et pH 4.* — L'addition d'éthanol provoque la formation d'un gel dans des conditions bien définies. Si à la solution de caséine on ajoute une solution hydro-alcoolique de façon que la concentration finale en alcool soit égale ou supérieure à 20 p. 100 et si on chauffe ce mélange dans un bain-marie porté à 60° C, on voit, au bout de deux à trois minutes, le mélange s'épaissir considérablement. Ce mélange maintenu au bain-marie cinq minutes donne, par refroidissement, un gel ferme et limpide. Ce gel porté à une température supérieure à 70° C se liquéfie et se solidifie par refroidissement. Si la concentration en caséine est supérieure à 9 p. 100, le gel obtenu dans ces conditions est opaque.

On peut d'ailleurs obtenir, dans cette zone de pH, un gel pour des concentrations en caséine de 5 p. 100 en présence de 20 p. 100 d'alcool. En l'absence d'alcool, il était impossible d'obtenir des gels de caséine pour une concentration aussi faible. L'action favorisante de l'alcool apparaît donc bien dans ce cas.

3° L'addition d'éthanol élargit la zone de précipitation autour de l'isoélectrique. Une opalescence marquée se produit entre pH 5 et pH 7,5, opalescence qui se transforme en floculation si l'on chauffe le mélange au bain-marie à une température supérieure à 40° C.

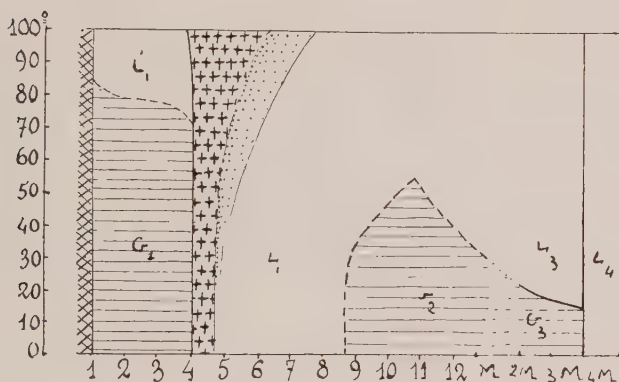
4° *Entre pH 9 et pH 12,* un gel apparaît au bout de six à huit

jours en présence d'éthanol à une concentration supérieure à 20 p. 100. Ce gel est limpide mais moins ferme que le gel formé en zone acide. Si on le chauffe au bain-marie très peu de temps après sa formation, il se liquéfie lorsque la température atteint 60° C et se reforme par refroidissement. Si on chauffe dans les mêmes conditions un gel formé depuis une dizaine de jours, il se liquéfie, mais ne se reforme pas par refroidissement.

5° *Entre pH 12 et pH 14.* — L'éthanol favorise la formation d'un gel, mais celui-ci est temporaire et disparaît spontanément environ vingt-quatre heures après sa formation.

En l'absence d'éthanol, il faut atteindre une concentration alca-

Caseine 8p.100. alcool 20p.100



line trois fois moléculaire pour obtenir un gel. Si on ajoute de l'éthanol à un gel obtenu dans ces conditions, celui-ci se liquéfie. Le gel ne se forme pas si l'éthanol est ajouté avant que la gélification n'ait eu le temps de se produire. Il faut, dans tous les cas, que la concentration alcoolique soit supérieure à 15 p. 100.

Si, au lieu d'éthanol, on utilise dans les mêmes conditions du méthanol ou du propanol, les phénomènes gardent la même allure. Cependant, l'action du propanol est plus énergique puisque, entre pH 3 et pH 4, en présence de propanol, il n'est pas nécessaire de chauffer pour faire apparaître le gel et entre pH 9 et pH 12, le gel apparaît au bout de cinq jours au lieu de huit jours.

Le diagramme résume l'action de l'éthanol à une concentration de 20 p. 100 en présence d'une concentration en caséine de 8 p. 100. Mais, étant donné le nombre considérable d'expériences nécessaires pour tracer avec précision les détails d'un diagramme, nous n'avons pas tracé avec une rigueur absolue chacun des diagrammes correspondant aux diverses concentrations. Nous indi-

quons sur le schéma ci-contre le diagramme approximatif dans lequel les pentes des courbes sont simplement indicatives. Les zones de transformations réversibles sont limitées par des traits pointillés, les transformations irréversibles par des traits pleins.

Nous avons voulu essayer de voir de quelle manière l'alcool intervient pour favoriser la gélification. Se combine-t-il aux molécules protéiques ? Ou bien favorise-t-il, par sa seule présence, l'aggrégation des molécules ?

Pour cela, nous avons soumis les gels obtenus en présence d'alcool à une dialyse contre un tampon dilué ayant le même pH que celui de la solution de caséine avant l'addition de l'alcool. Pour les gels acides, nous avons utilisé un tampon acide acétique acétate M/100 ; pour les gels alcalins, entre pH 9 et pH 12, un tampon M/100 phosphaté. Après cette dialyse, le gel acide subsiste, mais est un peu moins ferme. Par contre, le gel alcalin disparaît et laisse une solution de caséine fluide. L'alcool semble donc agir de façon différente selon les pH.

En milieu acide, ou bien il reste fixé aux molécules de caséine et ne peut être enlevé par dialyse, ou bien, une fois le gel formé, sa présence n'est plus nécessaire au maintien du gel s'il est enlevé par dialyse. Au contraire, en milieu alcalin, l'alcool n'est pas combiné aux molécules de caséine et sa présence est indispensable au maintien du gel. Ceci est un argument supplémentaire en faveur d'une différence de mécanisme du phénomène de gélification en milieu acide et en milieu alcalin.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MAGIS (C.). *Ces Annales*, 1950, **79**, 72.
- [2] BARBU (E.) et MACHEBOEUF (M.). *Ces Annales*, 1948, **74**, 300.
- [3] BARBU (E.) et MACHEBOEUF (M.). *Ces Annales*, 1948, **75**, 426.
- [4] BARBU (E.) et MACHEBOEUF (M.). *Ces Annales*, 1948, **75**, 226.

SUR LA PRÉSENCE DU BACTÉRIOPHAGE *PERFRINGENS* DANS LES EAUX ET SON RÔLE DANS L'ÉPURATION DES EAUX STAGNANTES

par A. GUELIN.

(Institut Pasteur et Laboratoire d'hydrobiologie du C. N. R. S.,
à Gif-sur-Yvette.)

Les difficultés rencontrées par les hygiénistes dans la détermination de l'origine de *E. coli* isolé des eaux polluées les obligent de plus en plus à recourir à la recherche de *Cl. perfringens*. L'isolement de ce germe complète heureusement les résultats de l'examen des eaux, contaminées par les animaux ou par l'homme.

Comme chaque espèce bactérienne présente dans un milieu naturel est en général accompagnée par les bactériophages actifs, nous avons cherché, avec M^{lle} Le Bris, à évaluer la quantité de bactériophages *perfringens* dans des eaux différemment polluées. Des résultats de ces recherches on constate que le taux du bactériophage *perfringens* varie toujours suivant le degré de pollution des eaux examinées ; les eaux les plus polluées renfermant une plus grande quantité de bactériophage. Ceci confirme nos précédentes recherches sur les phages de *Salmonella typhi* et de *E. coli*, et permet d'envisager l'application de la recherche du bactériophage *perfringens* à la détermination des eaux souillées.

Outre son rôle détecteur, le bactériophage *perfringens* nous a intéressée aussi comme un des facteurs éventuels de l'épuration biologique des eaux. Le problème de la participation du bactériophage à ce phénomène a été soulevé dès que Dumas eut, le premier, révélé la présence des phages *coli* et dysentérique dans les eaux de la Seine. Si Flu (1923-1927), Zdansky (1924) et Guidice (1931) refusent de voir dans le bactériophage un agent d'épuration des eaux, d'autres chercheurs, par contre, lui attribuent un rôle important. Arloing et Sempe (1926), Fortunato (1927), Fabry (1928), Boujanovsky (1929), Renaud (1929), Segre (1930), Beckwith et Rose (1930), Nick (1936), Tecce (1939) et Imbasciati (1941) supposent qu'il doit exister un rapport étroit entre la présence du bactériophage et l'auto-épuration des eaux.

Il est certain que la présence du bactériophage dans les eaux

ne doit pas être sans influence vis-à-vis des germes sur lesquels, dans les conditions du laboratoire, il manifeste une activité importante. On a toujours tendance à rapprocher le processus de l'épuration des eaux par le bactériophage du phénomène de la bactériophagie observée au laboratoire. Or, si la fixation des corpuscules-phages sur les bactéries peut avoir lieu dans les eaux naturelles, la multiplication des bactéries, dans ces conditions, n'est pas toujours certaine. Et comme le phénomène de la bactériophagie nécessite des cellules en division et l'augmentation considérable du taux bactériophagique, on se demande comment, dans ce cas, se réaliserait la destruction massive des germes par le bactériophage.

Il semble plus exact d'admettre qu'une bactérie présente dans l'eau et fixant une certaine quantité de bactériophage ne subit l'influence nocive de celui-ci qu'au moment où elle est placée dans des conditions favorables à sa multiplication (dans l'organisme ou les aliments, par exemple). Cette multiplication entraîne l'augmentation du taux du bactériophage fixé, suivie de la disparition des bactéries.

Les expériences, faites avec M^{lle} Le Bris, exposées dans le présent travail, confirment cette hypothèse et permettent d'envisager des recherches plus détaillées sur l'épuration des eaux par le bactériophage.

QUANTITÉ DE BACTÉRIOPHAGE *perfringens* DANS DES EAUX DIFFÉREMMENT POLLUÉES.

Il convenait de se rendre compte tout d'abord si le bactériophage *perfringens* se rencontrait couramment dans les eaux. Divers échantillons d'eau ont été examinés à l'aide de cinq souches du *Cl. perfringens* [T, M, 80 b, 40 et Am-8] (1). Ces souches ont été choisies en raison de leur réceptivité vis-à-vis des bactériophages *perfringens* de notre collection. La technique employée ne se distinguait pas, en principe, de celle utilisée pour la recherche des phages des bactéries aérobies. L'enrichissement était effectué avec l'ensemble des cinq souches, mais l'examen sur plaques de gélose a été fait avec chaque souche séparément.

Après avoir constaté que le bactériophage *perfringens* se rencontre assez fréquemment dans les eaux polluées, nous avons cherché à évaluer sa quantité.

Ces recherches ont été faites au moyen de prélèvements hebdomadaires, depuis septembre 1947. N'ayant pas la possibilité d'exposer ici tout le matériel, nous donnerons les résultats des

(1) Les souches 80 b et Am-8, tout en ayant beaucoup d'analogie avec l'espèce *perfringens*, doivent être considérées comme douteuses par certains caractères.

examens mensuels avec la souche 40 seulement. Chaque résultat est caractéristique pour l'ensemble des résultats d'un mois.

Le nombre des germes de *Cl. perfringens* dans l'eau est en général moins abondant que celui de *E. coli*. De ce fait, il n'est pas étonnant que le taux du bactériophage *perfringens* n'atteigne jamais le taux du bactériophage *coli* ou typhique, par exemple. C'est pourquoi nous avons été obligée d'augmenter jusqu'à 100 cm³ la dose maximum d'eau prélevée pour les recherches (au lieu des 20 cm³ habituels).

D'après les résultats exposés dans le tableau I, on constate la présence permanente du bactériophage *perfringens* 40 dans les eaux d'égout. Les prélèvements faits dans la Seine à Clichy, avant l'embouchure de cet égout, ne contiennent que rarement

TABLEAU I.

DATE des prélèvements	QUANTITÉ MINIMA D'EAU CONTENANT LE BACTÉRIOPHAGE (en cm ³)							
	Bactériophage <i>perfringens</i>				Bactériophage <i>coli</i>			
	Seine			Egout	Seine			Egout
	Avant Paris	Avant égout	Après égout		Avant Paris	Avant égout	Après égout	
1948								
31 janvier . .	0 (1)		0	1				
22 février . .	0		10	10				
7 mars . . .	0		0	5	1	1	0,001	0,001
30 avril . . .	0	0	100	1	1	1	0,1	0,0001
7 mai	0	0	0	1	10	1	0,01	0,001
4 juin	0	100	100	20	1	1	0,1	0,001
23 juillet . .	0	0	100	20	0,1	0,1	0,0001	0,0001
3 septembre	0	0	0	100	10	1	0,01	0,001
22 octobre . .	0	0	100	10	10	1	1	0,01
13 novembre .	0	0	0	10	10	1	0,1	0,001
1949								
17 septembre	0	100	10	5				
14 octobre . .	0	0	100	10				
4 novembre . .	0	100	100	5				
9 décembre . .	0	0	100	5				
1950								
20 janvier . .	0	0		5				
3 février . . .	0	100	1	1				
24 mars	0	0	100	20				
30 mai	0	0	0	100				
10 juin	0	0	0	20				

(1) Le zéro indique que le bactériophage n'a pas été trouvé dans 100 cm³.

du bactériophage 40 ; par contre, les eaux prélevées à Epinay, après le déversement de l'égout, en contiennent un plus grand nombre. Dans l'eau de la Seine à Choisy, en amont de Paris, nous n'avons jamais constaté la présence de bactériophage *perfringens* 40 (avec 100 cm³).

Ces recherches montrent que les eaux les plus souillées renferment un taux plus élevé de bactériophage *perfringens*.

L'ÉPURATION, A L'AIDE DU BACTÉRIOPHAGE,
DES EAUX SOUILLÉES PAR *Cl. perfringens* M.

Ayant constaté la présence du bactériophage *perfringens* dans les eaux, nous nous sommes demandé si cette présence pouvait contribuer à la disparition plus rapide de *Cl. perfringens*. Il fallait pour cela étudier le comportement des bactéries dans les eaux contenant le bactériophage actif et, en premier lieu, les variations de leur quantité.

La majorité de nos expériences ont été effectuées au laboratoire avec de l'eau d'étang, répartie dans des ballons de 2 à 5 litres. En même temps, nous donnons ici certains résultats des expériences, faites dans de grands bassins en dehors du laboratoire.

L'eau puisée dans l'étang et répartie soit dans les bassins, soit dans les récipients de laboratoire, n'était jamais stérilisée. L'étude préalable de cette eau a montré chaque fois l'absence totale de germes capables de se développer en gélose profonde. En utilisant toujours une souche connue et en faisant des expériences de courte durée, nous n'avons jamais rencontré de difficultés avec l'eau non stérilisée.

La souche non toxique du *Cl. perfringens* M et le bactériophage M actif sur cette souche ont été choisis pour les recherches. 5 cm³ d'une culture de vingt-quatre heures, préalablement centrifugés, et 0,5 cm³ de bactériophage, préparé en eau peptonée, ont été utilisés par litre d'eau. Les titrages des bactéries ont été faits en gélose profonde à 1,5 p. 100, préparée en bouillon Vf non glucosé.

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté que le titre de *Cl. perfringens* dans les eaux où le bactériophage actif a été introduit diminue extrêmement vite. Les résultats suivants font ressortir l'efficacité de l'action bactériophagique sur la disparition des germes après soixante minutes de séjour dans l'eau. Dans nos expériences, le pourcentage des bactéries disparues est établi par rapport aux bactéries témoins (séjournant dans l'eau, sans bactériophage, durant le même temps).

Il suffit de dix à vingt minutes pour que le taux bactérien s'abaisse souvent de 90 p. 100. Une de nos expériences, par

EXPÉRIENCES du laboratoire	QUANTITÉ DE BACTÉRIES par litre après 60 minutes		POURCENTAGE de bactéries disparues
	Sans bactériophage	Avec bactériophage	
A.	$1,2 \cdot 10^8$	$2,6 \cdot 10^5$	99,8
B.	$1 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^5$	99,4
C.	$8,2 \cdot 10^7$	$4,4 \cdot 10^5$	99,5
D.	$7 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^6$	98,2
E.	$4,8 \cdot 10^7$	$9 \cdot 10^5$	98,2
F.	$4 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^6$	99,9

exemple, montre la rapidité avec laquelle le titre bactérien diminue :

TEMPS en minutes	QUANTITÉ DE BACTÉRIES par litre	POURCENTAGE de bactéries disparues
0	$7 \cdot 10^8$	
5	$9 \cdot 10^7$	87
10	$6,6 \cdot 10^7$	90,6
20	$2,8 \cdot 10^7$	96
30	$2 \cdot 10^6$	99,7
45	$2,4 \cdot 10^6$	99,7
60	$2,5 \cdot 10^6$	99,7
90	$2,4 \cdot 10^5$	99,9

Ces expériences ont été répétées dans des bassins bétonnés contenant 500 litres d'eau d'étang. L'eau était renouvelée à chaque expérience. Les bassins sont disposés dans le parc, en plein air, ce qui les rapproche des conditions d'un puits ou d'un étang (2). 3 à 4 cm³ d'une culture de *Cl. perfringens* centrifugée, et 0,5 cm³ de bactériophage sont introduits chaque fois par litre d'eau.

Les résultats de ces expériences ont confirmé les recherches faites au laboratoire : dans les bassins contenant du bactériophage, le titre bactérien diminue considérablement par rapport à celui des bassins témoins :

La disparition rapide de *Cl. perfringens* dans les eaux contenant le bactériophage pose la question suivante : cette disparition a-t-elle lieu dans l'eau même, ou seulement dans la gélose profonde après les titrages, c'est-à-dire dans des conditions favorisant la multiplication bactérienne ?

(2) Parc du Laboratoire hydrobiologique du C.N.R.S., à Gif-sur-Yvette. Voir ces *Annales*, 1950, 78, 78.

EXPÉRIENCES de bassins	QUANTITÉ DE BACTÉRIES par litre après 60 minutes		POURCENTAGE de bactéries disparues
	Sans bactériophage	Avec bactériophage	
A.	$4 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^7$	90
R.	$8 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^6$	98,5
C.	$6,4 \cdot 10^7$	$5,6 \cdot 10^5$	99,1
D.	$1,6 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^4$	99,8

Pour répondre à cette question, il a été nécessaire de remplacer la méthode des titrages en gélose profonde par d'autres procédés, afin d'éliminer le développement des bactéries.

La numération des germes dans la cellule de Salimbeni nous a permis de réaliser ces expériences. Et nous avons vu la quantité de bactéries introduites dans l'eau avec le bactériophage rester sans changement notable. Les résultats d'une telle expérience sont résumés ci-dessous. Le titre bactérien a été évalué simultanément par les deux procédés, à l'aide de la cellule et en gélose profonde. D'après la numération des germes dans la cellule, leur quantité est restée presque invariable durant les deux heures de l'expérience, tandis que les ensemencements en gélose profonde accusaient une diminution progressive du titre bactérien :

TEMPS en minutes	QUANTITÉ DE BACTÉRIES ÉVALUÉES PAR L'ÉNUMÉRATION	
	Cellule compte-bactéries	Gélose profonde
0	$6,8 \cdot 10^9$	$1,4 \cdot 10^9$
5	$7,1 \cdot 10^9$	$6 \cdot 10^8$
20	$6 \cdot 10^9$	$1,2 \cdot 10^6$
40	$8,8 \cdot 10^9$	$1,3 \cdot 10^6$
60	$8,7 \cdot 10^9$	$9 \cdot 10^5$
90	$7,5 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^5$
120	$6,1 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^5$

Il n'y avait donc aucune lyse des bactéries dans l'eau contenant le bactériophage. Cependant il suffisait de transporter celles-ci en gélose profonde à 37° pour qu'elles disparaissent en grande partie. En même temps le taux du bactériophage dans cette gélose augmentait considérablement (la gélose était écrasée avec deux tiers d'eau peptonée et titrée ensuite). Cette augmentation du bactériophage indiquait que les bactéries transportées dans la gélose n'étaient, au moins pour la plus grande partie, ni

inhibées, ni lysées immédiatement, mais continuaient à se multiplier pendant un certain temps :

EXPÉRIENCES	QUANTITÉ DE BACTÉRIES après 20 minutes		QUANTITÉ de bactériophage
	Cellule compte-bactéries	Gélose profonde	
Bactéries seules	3. 10 ⁹	4.6.10 ⁸	
Bactéries + bactériophage	2,8.10 ⁹	4.8.10 ⁸	6 10 ¹⁰
Bactériophage seul.			2 10 ⁷

Le bactériophage M apparaît donc, dans nos expériences comme un facteur indirect d'épuration de l'eau. Les bactéries y fixant le phage restent indemnes et capables de se multiplier. Mais, à la moindre possibilité d'accroissement, elles déclencheront le développement intense des corpuscules bactériophagiques et finiront par être lysées.

Les divers échantillons d'eau ont été obtenus grâce à l'amabilité du D^r Coin, Chef de la Section du Service de Contrôle des Eaux de la Ville de Paris. Nous le remercions très sincèrement.

RÉSUMÉ.

Des recherches quantitatives des bactériophages, actifs sur la souche de *Cl. perfringens* 40, dans les eaux de la Seine et de l'égout de Clichy ont été effectuées, ainsi que des expériences sur le comportement de *Cl. perfringens* M en présence du bactériophage, dans les eaux, non stériles, d'un étang.

1° Le taux du bactériophage *perfringens* 40 dans les eaux varie suivant leur degré de pollution : les eaux les plus polluées contiennent davantage de bactériophage.

2° Le bactériophage *perfringens* M introduit dans l'eau avec *Cl. perfringens* M se fixe sur les bactéries, qui cependant ne subissent pas la lyse. Mais dès qu'on place ces bactéries dans des conditions favorables à leur multiplication, et par là même au développement du bactériophage fixé, elles disparaissent en grande partie.

3° Le bactériophage *perfringens* M apparaît donc, dans nos expériences, comme un facteur éventuel et indirect d'épuration des eaux stagnantes, ce qui permet d'envisager la continuation de ces recherches.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

Séance du 6 Juillet 1950.

Présidence de M. MAGROU.

COMMUNICATIONS (SUITE)

TRANSMISSION DE LA TUBERCULOSE PAR LES MOUCHES

par F. TISON.

Il est classique de dire que les mouches domestiques transportent toutes sortes de germes pathogènes.

Les mécanismes invoqués sont multiples : transport par les ventouses des pattes, par les poils et par la salive dont la mouche humecte les corps solubles pour les ingérer (sucre en particulier).

Par une expérience très simple et démonstrative nous avons voulu montrer la réalité de ces faits en ce qui concerne la tuberculose :

Sous une cloche ont été disposés, à 15 cm. environ l'un de l'autre, deux récipients.

L'un contenait des crachats de tuberculeux fraîchement émis par un malade moyennement positif (crachats mucopurulents non lavés).

L'autre, une solution stérile de glucose à 30 p. 100.

Quinze mouches domestiques ont alors été introduites sous la cloche et laissées vingt-quatre heures.

Le lendemain les mouches ont été tuées au chloroforme et la solution de glucose a été inoculée sous la peau de la cuisse d'un cobaye.

En trois semaines l'animal a été assez *fortement tuberculisé* avec adénopathie inguinale suppurée.

Les mouches peuvent donc transporter et déposer sur des matières alimentaires des bacilles tuberculeux venus de crachats.

Nous ne nous étendons pas sur les conclusions pratiques qu'on doit tirer de ces constatations : elles s'appliquent à l'hygiène des crachoirs qui doivent obligatoirement être munis de couvercle et à la lutte contre les mouches.

Or, il se trouve que ces insectes sont très abondants au voisinage des sanatoriums isolés qui ont les plus grandes difficultés à se débarrasser des ordures ménagères.

(Sanatorium de Praz-Coulant, Haute-Savoie.)

ESSAIS SUR LE VIRUS POLIOMYÉLITIQUE, SOUCHE LANSING, DE DIVERS COMPOSÉS ORGANIQUES ET DE QUELQUES GERMES ANAÉROBIES

par M^{me} M. GASTAMBIDE-ODIER (1).

Etant donné les moyens restreints dont nous disposons actuellement dans la lutte contre la poliomyélite [1, 2], nous avons effectué divers sondages concernant l'action de substances organiques et de germes anaérobies sur le virus poliomyélitique, souche Lansing.

Les résultats obtenus n'ont pas répondu à nos espoirs. Néanmoins, nous donnons ci-dessous la liste des corps et des germes étudiés avec les raisons qui nous ont incitée à les choisir.

A. TRAITEMENT PAR DIVERS COMPOSÉS ORGANIQUES. — *Hydroxy-2-triamino-4,5,6-pyrimidine (sulfate)* [1] (2). — Selon Foster [3], Toomey [4], Rasmussen [5] et Waisman [6], les souris soumises à un régime pauvre en thiamine sont moins sensibles à la poliomyélite que les souris nourries normalement. Par contre, leur résistance au virus poliomyélitique est augmentée par l'ingestion d'acide folique ou de ses dérivés [7]. D'autre part, Bisceglie [8] a montré que les rats consomment ou éliminent plus rapidement la thiamine lorsqu'on leur injecte de fortes doses d'acide folique. En conséquence, l'action de l'acide folique et de ses dérivés pourrait être due à une déficience en thiamine. Peut-on augmenter la résistance de la souris à la poliomyélite en lui faisant ingérer une pyrimidine de structure semblable à la thiamine et qui pourrait lui être antagoniste ?

Mc Kinstry et Reading [9] ont essayé diverses pyrimidines dont quelques-unes ont semblé avoir une légère action sur le virus de la poliomyélite murine. De même, Jones [10] a obtenu un résultat intéressant avec l'oxythiamine.

L'étude de l'hydroxy-2-triamino-4,5,6-pyrimidine fait donc suite à ces travaux.

β -2-thiényl-alanine [11] (3). — Plusieurs antagonistes d'acides aminés naturels ont été décrits [11, 12]. La β -2-thiényl-alanine inhibe le développement des organismes suivants : *S. cerevisiae*, *E. coli*, *L. arabinosus*, *S. faecalis*, virus de la vaccine. Son effet est annulé par la β -phényl- α -alanine [13, 14, 15]. On observe également le même antagonisme chez le rat [16]. Nous avons donc pensé qu'il serait intéressant d'étudier l'action de la β -2-thiényl-alanine sur le virus poliomyélitique.

(1) Ce travail a été exécuté grâce à une bourse octroyée par l'Union internationale des Sciences biologiques.

(2) Ce composé nous a été remis par M. le professeur M. Polonovski, à qui nous exprimons nos remerciements.

(3) Nous remercions M. P. Gley qui nous a remis les corps II, III, IV et V.

β -phényl- β -alanine (III). — Ce corps serait-il un inhibiteur, antagoniste éventuel de la β -phényl- α -alanine ?

β -phényl-sérine (IV). — La β -phényl-sérine est un antagoniste de la β -phényl- α -alanine [17]. Par sa structure elle se rapproche de la chloromycétine [18]. Inhiberait-elle le virus poliomyélitique comme elle inhibe l'*E. coli*, le *L. arabinosus* et le *S. faecalis* [17, 19] ?

Globuline de porc (V). — Il a été démontré que la γ globuline humaine contient des anticorps neutralisant le virus Lansing [20] ; aussi divers auteurs ont-ils étudié l'emploi de la γ globuline dans la prophylaxie de la poliomyélite [21, 22, 23].

Les données encourageantes de Bodian [22] nous incitent à reprendre le sujet en utilisant la globuline de porc.

B. TRAITEMENT PAR QUELQUES GERMES ANAÉROBIES. — Nous avons étudié l'action de 5 bactéries anaérobies (4) dont les propriétés fermentaires sont marquées [24, 25] : *Bactéries attaquant particulièrement les protéines* :

Clostridium bifermentans } non pathogènes.
Plectridium putrificum }

Clostridium histolyticum : pathogène, seul anaérobie capable de digérer le tissu conjonctif cru.

Bactéries non pathogènes attaquant particulièrement les hydrates de carbone :

Bifidobacterium bifidum : connu pour ses propriétés bactéricides et antiputrides dues à son pouvoir acidogène élevé (acide lactique).

Clostridium corallinum : attaque activement les glucides (fermentation acétono-butylique) et également les pectines.

Les ferments très actifs de ces bactéries auraient-ils une action sur le virus poliomyélitique ?

PARTIE EXPÉRIMENTALE.

A. TRAITEMENT PAR DIVERS COMPOSÉS ORGANIQUES. — *Traitement préventif*. — Le produit I aux doses de 100, 400 et 4.000 μ g en suspension dans 0,5 cm³ d'eau distillée (additionnée d'une petite quantité de gomme adragante) fait l'objet de 3 expériences séparées. Les souris albinos à traiter reçoivent par voie buccale :

- 10 ingestions de 100 μ g dans l'espace de douze jours ;
- 7 ingestions de 400 μ g dans l'espace de quinze jours ;
- 3 ingestions de 4.000 μ g dans l'espace de cinq jours. Ces 3 ingestions sont suivies de cinq jours de repos.

Il résulte de ce traitement que les ingestions trop fréquentes (série a) sont la cause d'une tendance à la formation d'abcès dans la région thoracique. Les ingestions suffisamment espacées sont mieux supportées.

Les produits II (1 cg. en solution dans 1 cm³ d'eau physiologique alcalinisée par de la soude caustique et neutralisée ultérieurement), III (1 cg. en suspension dans 1 cm³ d'eau physiologique additionnée

(4) Ces cultures proviennent du laboratoire du Dr A.-R. Prévot à qui nous exprimons tous nos remerciements.

d'une petite quantité d'amidon soluble), IV (1 cg. en solution dans 1 cm³ d'eau physiologique) et V (3 mg. en suspension dans 1 cm³ d'eau physiologique), sont inoculés à des souris suisses. On les inocule par voie sous-cutanée à la dose journalière de 1 cg. (II, III et IV) ou de 3 mg. (V) pendant cinq jours. L'inoculation du virus Lansing a lieu après un jour de repos.

Les produits II, IV et V sont bien supportés. Une souris sur 8 n'a pas supporté le produit III.

Inoculation du virus Lansing. — On utilise comme matériel d'inoculation des cerveaux et des moelles de souris atteintes de poliomyélite Lansing. Ce matériel est broyé au mortier, dilué au 1/20 [Ia (5), Ic, II, III, IV, V] ou au 1/40 (Ib) dans de l'eau physiologique et centrifugé. Les souris traitées et un lot de souris neuves (témoins) sont inoculées par voie intracérébrale avec 2-3/100 de centimètre cube du liquide virulent surnageant. Cette dose provoque au bout de dix jours, parmi les souris témoins, environ 50 p. 100 de morts ou de paralysies.

Traitement postérieur à l'inoculation du virus. — Produit I :

Le jour de l'inoculation les souris ne sont pas traitées.

Les jours suivants, le traitement est repris comme suit :

a) 0-8 ingestions de 100 µg dans l'espace de douze jours.

b) 1-4 ingestions de 400 µg dans l'espace de neuf jours.

c) 0-4 ingestions de 4.000 µg dans l'espace de huit jours.

Le nombre des ingestions varie suivant les dates de paralysie ou de mort des souris.

Produits II, III, IV et V : le jour de l'inoculation on reprend le traitement et on le poursuit les jours suivants à la même dose que précédemment. A partir de la date d'inoculation, les souris ont reçu 1 à 12 injections de produit suivant la date de leur mort ou de leur paralysie.

B. TRAITEMENT PAR QUELQUES GERMES ANAÉROBIES. — 5 séries d'expériences ont été effectuées avec le matériel suivant :

1° Liquide surnageant d'une culture de quatre jours de *Clostridium bifermentans* 446 A.

2° Liquide surnageant d'une culture de dix-neuf jours de *Clostridium bifermentans* 446 A.

3° Culture de vingt-quatre heures de *Clostridium bifermentans* 446 A.

4° Cultures de vingt-quatre heures des bactéries suivantes : *Bifidobacterium bifidum* Ti, *Plectridium putrificum* Bienstock, *Clostridium corallinum* TIR.

5° Culot de centrifugation d'une culture de vingt-quatre heures (centrifugation : vingt minutes à 5.000 tours) de *Clostridium histolyticum*.

Mélange des germes anaérobies et du virus Lansing. — Les cerveaux et les moelles de souris atteintes de poliomyélite Lansing sont broyés au mortier, dilués au 1/10 dans de l'eau physiologique ou dans du bouillon réductosé (1 cm³ de réductose par 5 cm³ de bouillon), et centrifugés. Le liquide surnageant et les cultures de germes anaérobies

(5) + pénicilline : 50 unités par centimètre cube.

sont mélangés dans des proportions définies et on les laisse en contact pendant quatre à trente-deux heures à température ordinaire. Le mélange *Clostridium histolyticum* + Lansing est neutralisé par du sérum antihistolytique avant l'inoculation. Dans les expériences témoins, on remplace les cultures de germes anaérobies par du bouillon ordinaire, du bouillon réductosé ou de l'eau physiologique.

On inocule les divers mélanges préparés à des souris albinos par voie intracérébrale (2-3/100 de cm³).

C. RÉSULTAT DES TRAITEMENTS. — Dix à douze jours après l'inoculation du virus nous constatons que les souris traitées (environ 10 animaux par produit ou germe étudié) succombent à la poliomyélite dans la même proportion que les souris témoins (environ 10 animaux par lot). En outre, l'examen histologique révèle que la proportion des lésions du cerveau et de la moelle est pratiquement identique chez les animaux traités et chez les témoins. Certaines souris (traitées et témoins) ont le foie malade (dégénérescence) ou les poumons fortement congestionnés.

CONCLUSION.

Les corps organiques et les germes anaérobies étudiés sont inefficaces dans la lutte contre la poliomyélite.

(Institut Pasteur. Service des Virus : Dr P. LÉPINE.)

BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. LEVADITI et P. LÉPINE, *Les ultravirus des maladies humaines*, 2^e édit., Maloine, édit. Paris 1948, 651.
- [2] P. LÉPINE, *Presse méd.*, 1949, 2.
- [3] C. FOSTER et al., *J. exp. Med.*, 1944, **79**, 221 et **80**, 257.
- [4] J. A. TOOMEY et al., *Yale J. Biol. Med.*, 1944, **16**, 477.
- [5] A. F. RASMUSSEN et al., *J. Inf. Dis.*, 1944, **74**, 41.
- [6] H. A. WAISMAN et al., *Arch. Biochem.*, 1945, **8**, 203.
- [7] R. N. BIETER et H. N. WRIGHT, in *Poliomyelitis (First inter. Conf.)*. — J. B. LIPPINCOTT, New-York, 1949, 276.
- [8] V. BISCEGLIE, *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1949, **31**, 1331.
- [9] D. W. MC KINSTRY et E. H. READING, *J. Franklin Inst.*, 1944, **237**, 422.
- [10] J. H. JONES et al., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, **69**, 454.
- [11] R. O. ROBLIN, *Chem. Rev.*, 1946, **38**, 255.
- [12] J. DUFRENOY, *Rev. Path. comp.*, 1949, **49**, 279.
- [13] V. DU VIGNEAUD et al., *J. Biol. chem.*, 1945, **159**, 385.
- [14] K. DITTMER et al., *J. biol. Chem.*, 1946, **164**, 761.
- [15] R. L. THOMPSON et M. L. WILKIN, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1948, **68**, 431.
- [16] M. F. FERGER et V. DU VIGNEAUD, *J. biol. Chem.*, 1949, **179**, 61.
- [17] E. BEERSTECHEER et W. SHIVE, *J. biol. Chem.*, 1946, **164**, 53.
- [18] D. BILLET, *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230**, 1074.
- [19] C. MENTZER et al., *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1950, **32**, 55.
- [20] J. F. ENDERS, *J. Clin. Invest.*, 1944, **23**, 510.
- [21] A. M. BAHLKE et J. E. PERKINS, *J. Am. med. Assoc.*, 1945, **129**, 1146.
- [22] D. BODIAN, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1949, **72**, 259.
- [23] A. BLOXSON, *Texas State J. Med.*, 1949, **45**, 468.
- [24] M. WEINBERG, R. NATIVELLE et A.-R. PRÉVOT, *Les microbes anaérobies*. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1937, 369, 383, 495, 552.
- [25] A.-R. PRÉVOT et M. RAYNAUD, *Ces Annales*, 1944, **70**, 182 ; *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **222**, 1531.

**SUR QUELQUES FORMES
D'ACTINOMYCÉTALES AÉROBIES OBSERVÉES
DANS LES SÉDIMENTS OLIGOCÈNES
DU BASSIN DE MANOSQUE (BASSES-ALPES)**

par HÉLÈNE WINOGRADSKY et J. APPERT.

En terminant notre précédent mémoire sur la microflore des eaux souterraines et les sédiments sulfureux oligocènes de la région de

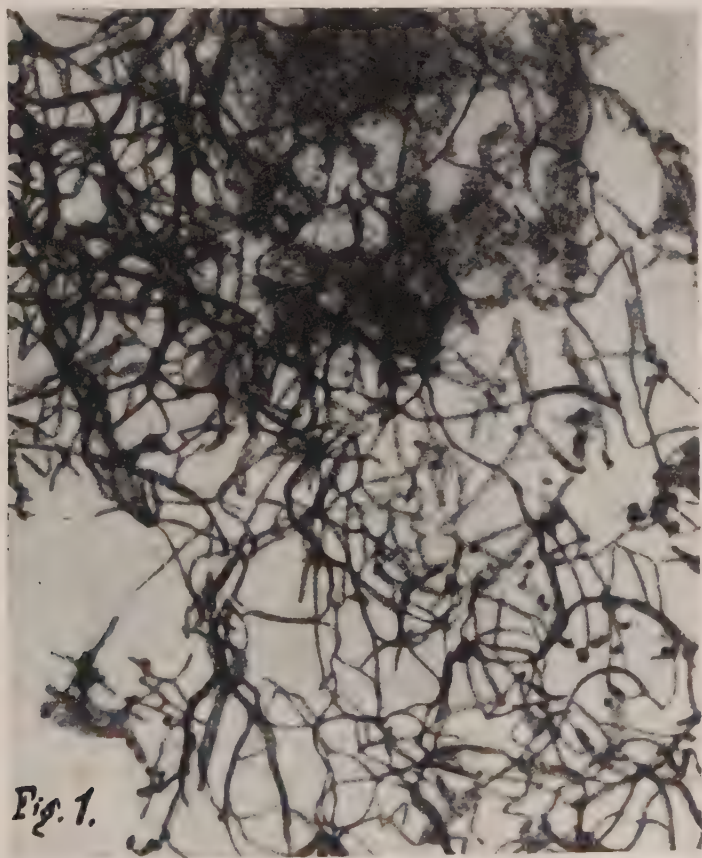


FIG. 1. — *Souche B* : culture sur gélose minérale humatée.
Mycélium végétatif et amas de spores. (Gross. : 1.400 X.)

Manosque [4], qui n'était qu'un bref aperçu de nos observations, nous avons souligné la présence d'organismes aérobies appartenant à l'ordre

des Actinomycétales. Il nous a semblé intéressant de faire une étude plus approfondie de ces espèces, de leur rôle possible dans le processus d'oxydation du soufre et de ses composés, rôle constaté par nous dans les cultures brutes en milieu minéral au thiosulfate ou au soufre,

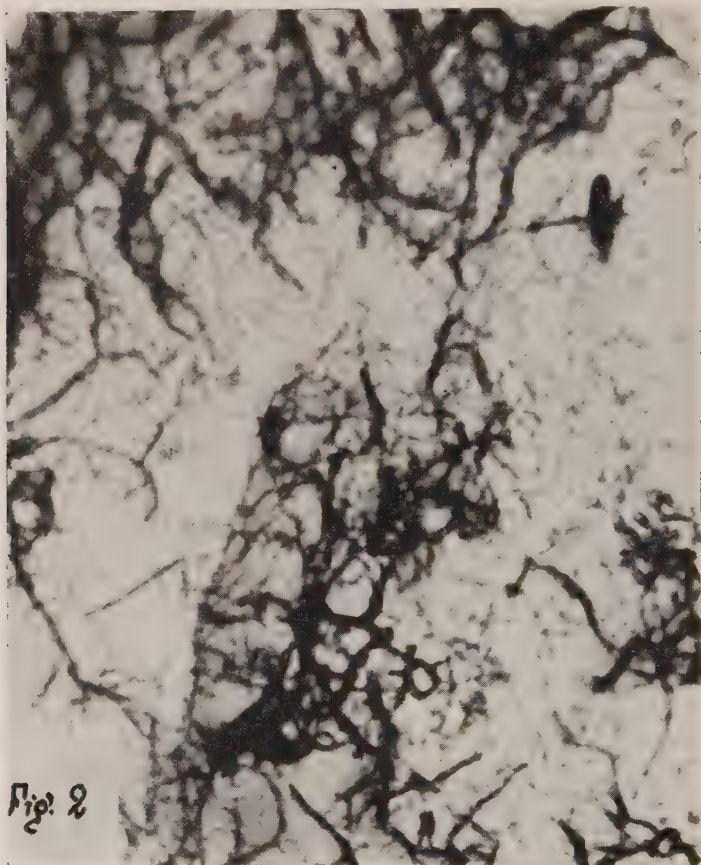


FIG. 2. — Souche P : culture sur gélose minérale humatée, âgée d'environ 3 mois. Hyphes sectionnées. (Gross. : 1.400 \times .)

et de leur comportement dans des milieux standards au laboratoire. Notre but était de chercher à préciser leur rôle dans les conditions écologiques des formations étudiées.

EXPÉRIENCES ET TECHNIQUES. — Nous avons suivi trois techniques.

1° Culture des souches, primitivement isolées, dans les milieux minéraux.

de Waksman 2 antérieurement utilisés pour l'étude des processus d'oxydation du soufre et de ses composés (1).

2° Culture de ces souches sur quatre des milieux standards, recommandés



FIG. 3. — *Souche R* : culture sur gélose minérale humatée, âgée d'environ 3 mois. Les hyphes sont sectionnées. (Gros. : 1.400 X).

(1) Nous rappelons la composition de ces milieux :

Milieu 65 au thiosulfate : thiosulfate de sodium, 5,0 g. ; chlorure d'ammonium, 0,1 g. ; bicarbonate de sodium, 1,0 g. ; phosphate disodique (ou bipotassique), 0,2 g. ; chlorure de magnésium, 0,1 g. ; eau distillée (ou du robinet), 1.000 cm³.

Milieu 68 au soufre : sulfate d'ammonium, 0,2 g. ; phosphate monopotassique, 3,0 g. ; sulfate de magnésium, 0,5 g. ; chlorure de calcium, 0,25 g. ; sulfate ferreux : traces ; fleur de soufre 10 g. ; eau distillée, 1.000 cm³.

par Waksman pour la culture des Actinomycètes du sol [3] et que nous nommons milieux I, II, III et IV (2).

3° Culture de toutes les souches,

y compris celles qui ont été isolées sur milieu au bouillon de haricot gélosé, sur milieu minéral gélosé additionné d'extraits d'humates. Nous avons utilisé deux milieux différents de ce type que nous nommons « III H » et « IV H ». Le milieu minéral gélosé de base de « III H » est le milieu III précédent, mais sans sucre, tandis que pour « IV H », c'est le milieu IV sans amidon. Ces milieux de base ont été additionnés de quantités variables d'extraits alcalins d'humates [4] pour les amener aux diverses valeurs de pH suivantes :

III H (N_2 NITRIQUE)

—
7,9
8,2-8,3
9,0 et 10,0

IV H (N_2 AMMONIACAL)

—
7,6-7,7
7,8-7,9
9,0-10,0

Nous appelons milieux « renforcés » les derniers milieux très alcalins riches en humates.

Dans le second et le troisième cas, les ensemencements étaient effectués en stries sur la gélose inclinée.



Fig. 4. — (a) Souche B et (b) Souche P : cultures sur gélose minérale humatée. Mycélium végétatif et mycélium sporulé.

(2) *Milieu I (gélose-glucosée)* : glucose, 10 g. ; phosphate bipotassique, 0,5 g. ; asparagine, 0,5 g. ; gélose, 15 g. ; eau distillée, 1.000 cm³.

Milieu II (citrate-glycérine-agar) : citrate de calcium, 10 g. ; chlorure d'ammonium, 0,5 g. ; phosphate bipotassique, 0,5 g. ; glycérine, 10 g. ; gélose, 15 g. ; eau distillée, 1.000 cm³ ; pH ajusté à 7,0 (lessive de soude).

Milieu III (gélose de Czapeck) : nitrate de sodium, 2,0 g. ; phosphate bipotassique, 1,0 g. ; sulfate de magnésium, 0,5 g. ; chlorure de potassium, 0,5 g. ; sulfate de fer, 0,01 g. ; saccharose, 30 g. ; gélose, 15 g. ; eau distillée, 1.000 cm³.

Milieu IV (gélose à l'amidon) : amidon soluble, 10 g. ; phosphate bipotassique, 1 g. ; sulfate de magnésium, 1 g. ; chlorure de sodium, 2 g. ; sulfate d'ammonium, 2 g. ; carbonate de calcium, 3 g. ; gélose, 10 g. ; eau distillée, 1.000 cm³.

RÉSULTATS. — En ce qui concerne les cultures en milieux au thio-sulfate ou au soufre, les souches d'Actinomycétales étudiées, particu-



FIG. 5. — *Souche P* : culture sur boîte de Petri à gélose minérale humatée : colonies de mycélium. (Gross. : 450 X.)

lièrement celles qui avaient été isolées de milieux où une oxydation active avait été observée, n'ont manifesté aucune activité. Les milieux sont restés inaltérés et les pH invariables dans les repiquages successifs.

Les caractères cultureux des souches étudiées et les résultats obtenus sur les milieux de Waksman, normaux ou modifiés avec addition d'extrait d'humates, ont été groupés dans les tableaux I et II.

On remarquera que les souches les plus résistantes dans les conditions du laboratoire, donc dans des conditions en général défavorables.

TABLEAU I. — Caractères des

NUMÉRO des souches	MILIEU de la culture-mère : minéral	MILIEU I	MILIEU II	
Eau II . . .	Gélose haricot + thiosulfate.	Mucus blanc-grisâtre.	Mucus vert.	Mucus laiteux
Eau II . . .	Milieu liquide 65.	Mucus abondant, lai- teux.	Mucus abondant, lai- teux.	Mucus a pâle. milieu
B.	Gélose haricot, en- suite : milieu 65.	Mucus rose corail et mycélium blanc	Mucus rose corail et très petites co- lonies de myc. blanc.	Mucus c tites c myc. lore le
B.	Milieu 65, plaques sil. gel thiosulfaté. Milieu liquide 65.	Mucus épais laiteux.	Mucus épais rose.	Mucus é
F	Milieu liquide 65.	Aucune pullulation sur les quatre milieux standards, surtout sur les milieux I, II et III qu'elles colorent.		
I	Milieu liquide 65.			
K.	Milieu liquide 65.			
O.	Milieu liquide 65.			
P.	Milieu liquide 65.	Mucus rose corail foncé.	Mucus rose corail foncé.	Mucus r
P.	Milieu 68 (sans soufre).			
R.	Milieu liquide 65.			
R.	Milieu liquide 68 (sans soufre).	Mucus jaunâtre, myc. sporulé : blanc.	Mucus rose pâle, myc. sporulé : blanc.	Mucus myc.

sont B, P et R. Elles se ressemblent au point qu'on pourrait les considérer comme appartenant à la même espèce (fig. 1, 2, 3 et 4).

Avant sporulation, elles forment un mycélium pigmenté sur les quatre milieux standards, surtout sur les milieux I, II et III qu'elles colorent.

A la sporulation le mycélium est blanc sur tous les milieux. Sur les milieux à humates, le mycélium est faiblement laiteux.

Les hyphes non sporogènes sont fines (diamètre : 0,5 μ), droites et peu ramifiées, Gram-positives, devenant partiellement Gram-négatives en vieillissant. Les hyphes sporogènes sont plus épaisses, légèrement spiralées.

On peut suivre les différents stades de la formation des spores, qui commence par une segmentation en éléments oblongs qui s'arrondissent et glissent hors de leur gaine, s'engainent de mucosités, devien-

nent fortement Gram-positifs, parfois difficilement colorables s'ils s'accroissent en agrégats. Le mycélium semble se reproduire par segmentation des hyphes : celles-ci se sectionnent en petits éléments de 1 μ de longueur aux extrémités très nettement « carrées », ressemblant à de petits bacilles. Les hyphes jeunes prennent naissance à l'un des

milieux minéraux.

	MILIEU III H pH : 7,9	MILIEU IV H pH : 7,7 à 7,8	MILIEU III H pH : 8,2 à 8,3	MILIEU IV H pH : 7,8 à 7,9	MILIEUX III H ET IV H « renforcés »	MILIEUX III H ET IV H contenant humates de Ca
bâtre.						
, lai-						
. Pe-	Mucus faiblement laiteux. Petites colonies de mycélium sporulé sur					
es de	tous les milieux.					
	Pas de pullulations caractéristiques sur aucun des milieux.					
	Pas de pullulations caractéristiques sur aucun des milieux.					
	»					
	»					
orail.	»					
	»					
	Mucus faiblement laiteux. Très petites colonies de mycélium sporulé					
	blanc sur tous les milieux.					
	Pas de pullulations caractéristiques sur aucun des milieux.					
, myc.	Mucus faiblement laiteux. Très petites colonies de mycélium sporulé					
anc.	blanc.					

« angles » d'une des extrémités du petit bâtonnet, parfois presque simultanément aux « angles » opposés. Le même caractère a été signalé par von Plotho pour des souches d'Actinomycètes qu'il a étudiées [5],

Sur la figure 5 on aperçoit quelques amas de mycélium assez caractéristiques de nos trois souches B, P et R (la photographie a été prise sur une plaque de Petri, gélose minérale humatée d'une culture de la souche P).

La pigmentation et l'odeur, pour O et P, ont été très nettes sur les milieux standards et totalement absentes sur les milieux à humates ainsi que sur le milieu 68 sans soufre où, pourtant, se formait une couche épaisse de mycélium. Dans ce cas particulier, il nous est difficile de nous prononcer sur les facteurs qui déterminent ce phénomène. Quelques chercheurs, von Plotho [5], Krainsky [6], Waksman [7], considèrent que la formation du pigment dépend de la nature de la

source de carbone. Le premier de ces auteurs a obtenu de bons résultats sur un milieu au glycérol et au glucose. Nous n'avons pas encore fait cette expérience, mais on verra sur les tableaux I et II que les milieux standards favorisent la formation de pigment, surtout le milieu III (Czapeck modifié) où toutes les souches donnent un pigment orangé à brun foncé, soluble, le mycélium sporulé restant blanc à l'exception de O et P pour lesquels il est gris.

Selon von Plöth, l'alcalinité du milieu serait favorable à la formation du pigment. Or, les milieux standards employés par nous ont un pH d'environ 7,5, tandis que les milieux à humates atteignent un pH de 7,8 à 8,3 et même de 8,8 à 9,0 et plus. Les souches B, P et R toléraient bien ces pH élevés mais n'y donnaient pas de coloration.

TABLEAU II. — Caractères de

NUMÉRO des souches	CULTURES-MÈRES milieu gélose-haricot	MILIEU I	MILIEU II
D113H1 e (a)	Pullulations roses en verrues.		
F e.	Gris jaunâtre brunis- sant la gélose.	Rosé pâle.	Blanc
I d (b)	Brun clair.	Blanc.	Rose tr.
I e (b)	Brun clair, myc. spo- rulé : blanc.	Blanc.	Blanc
K a (a)	Brun clair, myc. spo- rulé : blanc.	Blanc.	Blanc
K c (a)	Brun clair.	Blanc.	Blanc
O c (II)	Gris, noircissant la gé- lose. <i>Odeur de terre.</i>	Blanc.	Blanc
P f.	Gris, noircissant la gé- lose. <i>Odeur de terre.</i>	Blanc.	Blanc
R a (b)	Brun jaunâtre.	Blanc.	Blanc
R b.	Brun jaunâtre.	Blanc.	Blanc
R e.	Brun foncé, brunissant la gélose.	Blanc.	Orange

Par ailleurs, nous avons constaté que les souches qui ont été entretenues sur un milieu organique sans métabolite spécifique (bouillon de haricot gélosé) conservent une grande vitalité qui leur permet de pousser abondamment dans les milieux standards et sur les milieux à humates. Au contraire, les repiquages provenant de cultures entretenues sur milieux minéraux à métabolites spécifiques se développent beaucoup plus difficilement sur humates.

CONCLUSION. — Nous avons étudié diverses souches d'Actinomycétales aérobies isolées des sédiments oligocènes du bassin de Manosque constitués par des calcaires bitumineux riches en soufre.

Nous avons décrit leurs caractères culturels et leur aspect microscopique.

Nous avons constaté qu'en culture pure elles n'ont aucune action sur le soufre ni sur les thiosulfates.

Par contre, sur 8 souches étudiées, 7 peuvent se développer sur des milieux à base d'humates alcalins et, particulièrement, 3 d'entre elles.

Il est possible que ces espèces vivent, en partie, aux dépens d'humates contenus dans les formations étudiées ou de ceux qui pourraient leur être apportés par les eaux météoriques.

(Institut Pasteur. Service de M. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE,
Service des Fermentations et Institut Français du Pétrole.)

milieux organiques.

III	MILIEU IV	MILIEU III H à pH : 7,9,	MILIEU IV H à pH : 7,7 à 7,8
		Aucune pullulation.	
âtre, brun- géluse.	Blanc.	Mucus faiblement laiteux, mycélium sporulé blanc.	
nissant la	Blanc.	Mucus faiblement laiteux, mycélium sporulé blanc.	
nissant la	Blanc.	Mycélium végétatif faiblement laiteux. Pas de mycélium sporulé.	
lorant pas	Blanc.	Mêmes caractères que ci-dessus.	
lorant la	Blanc.	Mêmes caractères que ci-dessus, mais les pullulations sont plus pauvres.	
	Blanc.	Mêmes caractères, mais les pullulations sont pauvres. <i>Pas d'odeur.</i>	
nissant la	Blanc.	Mêmes caractères. Pullulations pauvres. <i>Pas d'odeur.</i>	
re, jaunisse.	Blanc.	Mêmes caractères. Colonies de mycélium sporulé très petites.	
re, colorant a géluse en	Blanc.	Mêmes caractères. Colonies de mycélium sporulé très petites.	
sant la gé-	Blanc.	Mêmes caractères. Colonies de mycélium sporulé très petites.	

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Hélène WINOGRADSKY et J. APPERT. *Ces Annales*, 1950, **78**, 365.
- [2] S. A. WAKSMAN. *Lab. Man. gen. Micr.*, New-York, 1928.
- [3] S. A. WAKSMAN. *Principles of Soil Micr.*, Baltimore, 1927.
- [4] S. WINOGRADSKY, *Microbiologie du sol*, Paris, 1949.
- [5] O. von PLOTTO, *Arch. Mikr.*, 1940, **41**, 33.
- [6] A. KRAINSKY. *Cent. Bakt.*, II, 1914, **41**, 649.
- [7] S. A. WAKSMAN. *J. Bact.*, 1919, **4**, 189 ; *J. Bact.*, 1920, **5** 1 ; *Principles Soil Micr.* Baltimore, 1927.

EXISTENCE D'UNE CAPSULE GLUCIDIQUE CHEZ *BACILLUS MEGATHERIUM*

par J.-P. AUBÉRT et M^{lle} J. MILLET.

Dans un travail précédent, l'un de nous a signalé, dans les cellules de *B. megatherium* cultivé en milieu synthétique glucosé, l'existence d'un polyside extractible à l'eau bouillante (1). La présente note a pour but de préciser la nature capsulaire de ce polyside.

Pour les colorations, nous avons employé la méthode de Churmann et Emelianoff modifiée par M^{me} Lenormand (2) : on étale la suspension microbienne sur la lame et on laisse sécher à l'air. On plonge la lame



FIG. 1.

FIG. 2.

dans une solution de Giemsa R pendant une à deux minutes, on lave au tampon de Clark-Lubs (pH 6,4) et on laisse sécher à l'air. Les corps bactériens apparaissent en bleu et la capsule en rose pâle.

Les bactéries sont cultivées en milieu synthétique liquide glucosé dans des fioles d'Erlenmeyer de 1 litre agitées, et récoltées après quatorze à seize heures alors qu'elles sont encore dans la phase de croissance. Une partie est utilisée immédiatement pour les préparations colorées. Une autre est traitée à l'eau bouillante pendant deux heures pour extraire le polyside, puis soumise à la même méthode de coloration.

La fig. 1 représente les bactéries normales, la fig. 2 les bactéries traitées à l'eau bouillante.

Sur la fig. 1, on distingue nettement autour des bactéries une zone claire qui n'existe pas autour de celles de la fig. 2. Cette structure

(1) J. P. AUBERT, *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **229**, 477.

(2) M^{me} LENORMAND, *Ann. Parasitol.*, 1948, **23**, 55.

existe donc dans les bactéries contenant le polyoside, elle n'existe plus lorsque le polyoside est extrait.

D'autre part, *B. megatherium* cultivé en présence de 2-3 butanediol comme seul substrat carboné, ne forme pas de polyoside (1). Les bactéries obtenues dans ces conditions ne présentent après coloration aucune structure externe caractéristique.

Ces faits prouvent que la structure externe révélée par coloration est de nature polyosidique.

Dans une étude faite en 1944, Dubin et Sharp (3), d'après des photographies au microscope électronique de *B. megatherium*, concluent à l'existence de deux structures bien définies : l'une intérieure dense, l'autre extérieure de densité nettement plus faible, qui serait la paroi cellulaire, invisible au microscope ordinaire.

Dans notre cas, la nature polyosidique de la structure externe, permet de conclure, non pas à la mise en évidence de la paroi cellulaire, mais à l'existence chez *B. megatherium* d'une capsule semblable à celle de nombreuses autres espèces bactériennes.

(Service des Fermentations, Institut Pasteur.)

FIXITÉ DE VIRULENCE DES *SALMONELLA*

par J. BRISOU et J. BRANGIER.

La recherche d'une technique aussi précise que possible permettant d'apprécier le pouvoir protecteur d'un sérum vis-à-vis d'une *Salmonella* pour la souris nous a conduits à mesurer la dose minima mortelle de germes (DMm) en poids sec par centimètre cube de suspension (1).

Dans la note citée en référence, nous avons, en effet, insisté sur les divergences constatées entre les résultats publiés par différents auteurs. Il semble bien que le désaccord relève de raisons techniques.

Depuis plusieurs mois, les doses minima mortelles sont exprimées en poids sec. On peut alors se rendre compte que la virulence des souches est d'une remarquable constance. C'est ainsi que la souche « typhosum Ty2 » tue la souris à 20 μ g ; pour d'autres souches la DMm est de 40 μ g ; toutes les souches de *paratyphosus* B que l'on a testées tuent la souris à 50 μ g.

Les souches sont entretenues sur une gélose à la viande préparée selon les techniques classiques. Une fois la DMm d'une souche établie par pesée, on peut la considérer comme stable, tout au moins dans les limites actuelles de notre expérimentation (environ dix mois).

La détermination de 3, 5, 10 doses minima mortelles pour une souche donnée devient alors extrêmement simple tout en étant plus précise. En faisant usage de la technique déjà indiquée (1), les tests de séro-protection y gagnent en concordance. Les mesures de suspensions

(3) I. N. DUBIN et D. G. SHARP, *J. Bact.*, 1944, **48**, 313.

(1) J. BRISOU et J. BRANGIER, ces *Annales*, 1950, **78**, 793.

microbiennes par les procédés néphélométriques restent des méthodes cliniques ou industrielles. Elles ne conviennent pas à la détermination d'une dose minima mortelle de germes. L'estimation de cette valeur exige le procédé de mesure le plus rigoureux possible ; il est représenté, à l'heure actuelle encore, par la détermination du poids sec de bactéries par centimètre cube de suspension en eau distillée.

L'utilisation systématique de cette méthode montre que la virulence de germes de collection (comme la souche *typhosum* T₂) ou de germes récemment isolés, reste remarquablement constante et oscille, suivant les souches, entre 20 et 50 μ g.

(Ecole de Santé Navale et Coloniale, Bordeaux.)

ACTION DU CHLORAMPHÉNICOL *IN VITRO* ET *IN VIVO* SUR QUELQUES PASTEURELLES ANIMALES

par J.-L. GAUTHIER.

À la suite de prélèvements reçus au cours d'épidémies de pasteurelloses animales, nous avons isolé plusieurs souches d'origine porcine et ovine, et une souche provenant d'un lapin de garenne. Nous avons complété cette série avec une souche aviaire.

L'emploi thérapeutique du chloramphénicol vis-à-vis de certains germes Gram-négatifs étant connu, nous avons étudié l'action de cet antibiotique sur nos souches de pasteurelles animales d'origine différente, *in vitro* et *in vivo*.

Nous avons d'abord recherché les caractères morphologiques et biochimiques de ces souches ainsi que leur pouvoir pathogène sur la souris. Pour cette expérience nous avons utilisé les souches suivantes :

Deux souches (B et D) isolées respectivement de rate et de poumon de porcs, une souche (L) isolée de la rate d'un lapin de garenne, une souche (O) isolée du jétage d'une brebis atteinte de la forme pulmonaire de la maladie, une souche aviaire [A] (1).

Avant d'utiliser ces souches nous avons exalté leur virulence par passages successifs sur la souris, en isolant chaque fois les germes par hémoculture du sang du cœur.

Nous avons déterminé la dose minima mortelle en inoculant des lots de souris qui ont reçu par voie intrapéritonéale 1/10 de cm^3 de dilutions à des taux croissants de cultures en bouillon-sérum âgées de vingt-quatre heures. Les résultats de ces titrages furent les suivants :

Souche B	1 cm^3	de culture	con'tenait	10 ⁸	doses	minima	mortelles.
Souche D	1 cm^3	—	—	10 ⁵	—	—	—
Souche L	1 cm^3	—	—	10 ⁵	—	—	—
Souche O	1 cm^3	—	—	10 ⁴	—	—	—
Souche A	1 cm^3	—	—	10 ⁴	—	—	—

(1) Nous remercions M. le Dr Staub qui nous a obligeamment donné cette souche.

Après avoir vérifié une dernière fois la pureté des souches ainsi passées par la souris, nous avons étudié l'action *in vitro* et *in vivo* du chloramphénicol sur ces pasteurelles.

Nous avons préparé des séries de tubes de bouillon-sérum additionnés de chloramphénicol aux doses de :

0,25, 0,50, 1,00, 1,50, 2,00, 2,50 μg . par centimètre cube, sous un volume uniforme de 9 cm^3 et nous les avonsensemencés avec 1 cm^3 d'une culture âgée de vingt-quatre heures, des différentes souches. La croissance des tubes témoins et des tubes additionnés de l'antibiotique fut suivie à l'électrophotomètre de Meunier.

Dans tous les cas, la culture a été inhibée à partir de 0,50 μg . par centimètre cube, malgré la grosse quantité de semence ajoutée à chaque tube (1/10 du volume total). A partir de 1 μg . par centimètre cube, nous avons constaté une lyse des germes indiquée par la diminution de la densité optique. A titre d'exemple, nous reproduisons le tableau d'une des expériences effectuée avec la souche B :

DOSES de chloramphénicol en μg par cm^3	APRÈS 24 HEURES	APRÈS 48 HEURES	APRÈS 48 HEURES
0,25	+ 17	+ 20	+ 18
0,50	+ 17	+ 20	— 4
1	+ 15	+ 7	— 13
1,50	+ 8	+ 3	— 13
2	+ 11	+ 6	— 13
2,50	+ 9	+ 4	— 13
T	+ 77	+ 147	+ 167

Nous avons essayé ensuite l'action de cet antibiotique *in vivo* sur des souris préalablement inoculées par voie intrapéritonéale avec des cultures âgées de vingt-quatre heures et tuant régulièrement au 1/100.000 de cm^3 .

Pour chaque souche, nous avons utilisé des lots de 3 souris de même sexe et de même poids (18 à 20 g.) qui ont reçu : 100, 1.000, 10.000, 100.000 doses minima mortelles, et un lot témoin qui a reçu 10 D. m. m.

Les souris ont été traitées par voie digestive à l'aide d'une sonde introduite dans l'estomac. Nous avons utilisé une solution aqueuse de chloramphénicol à 1 mg. par centimètre cube. Ce traitement a été commencé deux heures après l'inoculation et fut poursuivi toutes les trois heures, chaque dose étant de 0,25 cm^3 , soit 250 μg . Il a été interrompu pendant la nuit et repris le lendemain.

Au total, les animaux eurent une moyenne de 4 à 6 traitements, représentant une dose de 1 mg. à 1,50 mg. de chloramphénicol par souris.

Dans ces conditions, nous avons obtenu les résultats suivants :
1° Lot témoin recevant 10 d. m. m. : mortalité : 100 p. 100 en douze à vingt-quatre heures.

2° Lots traités recevant 100 à 100.000 d. m. m. : survie : 100 p. 100 après vingt-quatre heures de traitement.

Pour chaque souche, l'expérience a été répétée trois fois.

En résumé, le chloramphénicol empêche *in vitro* la croissance des pasteurelles étudiées au taux de 0,5 μ g. par centimètre cube.

In vivo, cet antibiotique protège 100 p. 100 des souris inoculées avec 10⁵ doses minima mortelles, au taux de 50 à 75 milligrammes par kilogramme d'animal, réparti sur vingt-quatre heures de traitement. En raison de ces résultats très probants, nous nous proposons d'essayer ce produit en médecine vétérinaire.

(Institut Pasteur, annexe de Laroche-Beaulieu.)

ANTIBIOTIQUES ET LYSÉ BACTÉRIOPHAGIQUE

VI. — ACTION DE LA CHLOROMYCÉTINE SUR LA CULTURE D'UN STAPHYLOCOQUE ET SUR LA LYSÉ BACTÉRIOPHAGIQUE DE CETTE CULTURE

par MICHEL FAGUET et ÉWALD EDLINGER.

Après les études de P. Nicolle et M. Faguet [1, 2], sur l'action conjuguée de la pénicilline et du bactériophage, et de M. Faguet et E. Edlinger [3, 4] sur l'action de la streptomycine et du bactériophage sur des cultures bactériennes dont les variations d'opacité étaient enregistrées au moyen du microbiophotomètre de M. Faguet [5], nous avons voulu utiliser cet appareil pour l'observation des phénomènes qui se produisent, lorsque la chloromycétine est introduite dans une culture bactérienne en même temps qu'un bactériophage.

Technique : Nous avons choisi pour nos expériences comme dans les cas précédents le staphylocoque blanc Twort et le bactériophage homonyme. Ce choix nous a paru justifié par différentes raisons :

1° Les expériences mentionnées ci-dessus [1, 4] ont utilisé également le même système bactérie-bactériophage. Nous aurons ainsi le droit de comparer les différences dans l'action des antibiotiques.

2° Le bactériophage Twort est un des rares phages qui ne donnent qu'exceptionnellement des cultures secondaires (P. Nicolle et P. Ducrest) [6]. La lyse est ainsi plus facilement observable.

3° La chloromycétine est relativement peu active sur les staphylocoques (Bliss et Todd) [7]. Le fait nous a semblé avantageux puisqu'on peut espérer que l'action bactériostatique de la chloromycétine ne masquera pas trop l'action éventuelle de l'antibiotique sur la lyse phagique.

Nous avons utilisé dans nos expériences des échantillons de chloromycétine commerciale (Chloramphénicol) Park, Davis et Co, en capsules de 0,25 g. Cette substance stable et très résistante à la chaleur [8] n'est soluble dans l'eau qu'à la concentration d'environ 2 mg. par centimètre cube. Elle est d'autre part assez soluble dans le propylène glycol à 70° C. [9].

Nous avons préparé une solution mère en dissolvant 25 mg. par

centimètre cube de chloromycétine dans 20 p. 100 de propylène glycol. Elle est ensuite diluée avec de l'eau distillée jusqu'aux dilutions nécessaires à nos essais.

Les six cuves de l'appareil contenaient 20 cm³ d'eau peptonée à 3 p. 100 (peptone Uclaf). Elles étaient ensemencées avec 1-2.10⁶ germes par centimètre cube de milieu. Les cultures étaient agitées constamment par un système d'aspiration déjà décrit par l'un de nous.

Le titre du bactériophage était, au moment de l'introduction 2.10⁷ particules par centimètre cube de milieu. Le phage provenait d'un lysat phagique titrant 8.19⁹ particules par centimètre cube.

La figure 1 montre le résultat d'une expérience dans laquelle nous avons étudié l'action de l'antibiotique sur le germe seul.

La courbe-témoin montre la croissance normale de la culture bactérienne.

Les autres cultures ont reçu après le milieu de la phase exponen-

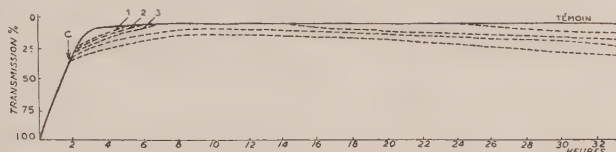


FIG. 1. — Action de la chloromycétine sur une culture de staphylocoque blanc Twort. γ , intervention ; 1, 0,25 μ g ; 2, 5 μ g ; 3, 12,5 μ g ; 4, 50 μ g ; 5, 250 μ g de chloromycétine par centimètre cube.

tielle des doses croissantes de chloromycétine allant de 0,25 à 250 μ g par centimètre cube. Les cultures qui n'ont reçu que 12,5 μ g et moins par centimètre cube d'antibiotique montrent un léger retard de la croissance mais leurs courbes atteignent le niveau de la courbe-témoin. Sur les courbes qui montrent l'influence de 50 à 250 μ g de chloromycétine par centimètre cube sur la culture, le ralentissement de la croissance est plus prononcé et la culture s'arrête à un niveau plus bas que celui de la culture témoin. Après des temps différents qui sont d'autant plus courts que la dose de chloromycétine employée est plus forte, les courbes de turbidité amorcent un mouvement très lent de descente. A la fin de l'expérience (trente-deuxième heure), on constate que les dénivellations produites par cette bactériolyse chloromycétinique sont d'autant plus grandes que la concentration en antibiotique avait été plus élevée.

Sur la figure 2 sont réunis des exemples de différentes expériences faites avec la même quantité de germes et d'antibiotique, mais on a ajouté le phage en même temps que la chloromycétine.

La courbe-témoin montre la lyse qui survient presque aussitôt après l'introduction du phage. Elle est brusque, totale et durable.

Les autres cultures qui ont reçu l'antibiotique montrent dans leur courbe ascendante sensiblement le même aspect que les cultures correspondantes de la figure 1. Mais après la dixième heure, leur allure change.

La culture 1 ayant reçu 0,25 μg d'antibiotique par centimètre cube présente une diminution d'opacité relativement rapide, interrompue par un plateau d'une durée de douze heures. Puis, la descente reprend, sensiblement à la même vitesse. Enfin, un nouveau plateau termine l'évolution de cette culture.

Les autres courbes montrent une lente diminution de turbidité, d'autant plus intense que la dose de l'antibiotique introduite a été plus forte. Cette diminution de turbidité est toujours plus accentuée que celle que nous avons décrite pour les mêmes concentrations de chloromycétine non additionnées de bactériophage (fig. 1).

DISCUSSION. — Les expériences confirment le fait déjà signalé [7] que l'action de la chloromycétine sur une culture de staphylocoque est relativement faible. L'antibiotique n'empêche pas la croissance ultérieurement à son introduction, mais il ralentit la phase exponentielle. Les

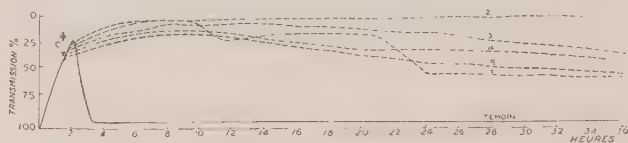


FIG. 2. — Action de la chloromycétine sur la lyse bactériophagique du staphylocoque Twort. Ψ , intervention; Φ , adjonction de 2.10^7 particules du phage Twort par centimètre cube; 1 à 3, mêmes doses de chloromycétine que dans la figure 1.

fortes doses, toutefois, ne permettent plus le développement complet de la croissance. D'autre part, il existe une relation proportionnelle entre la quantité d'antibiotique utilisée et la vitesse de la diminution de l'opacité des cultures après qu'elles ont atteint leur maximum de croissance. L'inhibition de la culture par l'antibiotique résulterait d'une bactériolyse lente.

L'action de la chloromycétine sur la lyse phagique est nettement défavorable. Dans le meilleur cas, c'est-à-dire avec une dose très faible, la lyse est très ralentie et incomplète, mais elle est encore apparente. Avec des doses plus fortes, cette lyse est complètement inhibée.

L'action bactériostatique qui est la cause du retard ou d'empêchement de la lyse par la pénicilline [1, 2] ou par la streptomycine [3, 4] ne peut entrer ici en jeu que pour une faible part puisque la chloromycétine ne fait que ralentir la croissance et ne l'arrête pas.

On pourrait donc envisager une action anti-phage. La chloromycétine qui, on le sait, est active sur quelques virus (Ehrlich et coll.) [8], (Smadel et Jackson) [10, 11], (Barski et Maurin) [12] a-t-elle une action phagicide ou bien intervient-elle dans les processus de fixation, de multiplication ou de libération du phage? Des recherches ultérieures nous permettront peut-être d'en trouver l'explication.

La présence du phage dans des cultures mises en contact avec 5 μg et plus de chloromycétine par centimètre cube n'est marquée que par

une légère accélération de la bactériolyse chloromycétinique. On pourrait supposer que la lyse phagique est incluse dans cette descente progressive de la courbe de la culture. Mais, le degré de la descente est en rapport avec la quantité d'antibiotique : plus la dose est grande plus nette apparaît l'action antiphage. Nous ne pouvons encore trouver aucune explication. Toutefois, il ne nous paraît pas possible de parler d'une synergie du phage et de la chloromycétine semblable à celle qui a été observée par différents auteurs (Himmelweit) [43], Nicolle et Faguet) [4], (Elford) [44], dans le cas du phage et de la pénicilline.

RÉSUMÉ. — La chloromycétine n'a qu'une faible action sur la culture du staphylocoque blanc Twort. Cependant, la période de croissance est ralentie et il se produit en dernier lieu une diminution lente et progressive de l'opacité des cultures.

Le même antibiotique inhibe la lyse bactériophagique avec des doses moyennes et fortes ; cette lyse est retardée et interrompue avec des doses très faibles ; seulement la phase de diminution de la turbidité due à la chloromycétine est sensiblement accélérée.

(Institut Pasteur. Service du Bactériophage.)

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. NICOLLE et M. FAGUET, ces *Annales*, 1947, **73**, 490.
- [2] M. FAGUET et P. NICOLLE, ces *Annales*, 1947, **73**, 1150.
- [3] M. FAGUET et E. EDLINGER, ces *Annales*, 1949, **77**, 204.
- [4] E. EDLINGER et M. FAGUET, ces *Annales*, 1950, **78**, 144.
- [5] M. FAGUET, *Act. Sci. et Ind.*, Hermann, édit. Paris, 1941, 102.
- [6] P. NICOLLE et P. DUCREST, ces *Annales*, 1947, **73**, 755.
- [7] E. A. BLISS et H. P. TODD, *J. Bacteriol.*, 1948, **58**, 61.
- [8] J. EHRLICH, O. R. BARTZ, R. M. SMITH et P. R. BURKCHOLDER, *Science*, 1947, **106**, 417.
- [9] E. EDLINGER, ces *Annales*, 1950, **78**, 417.
- [10] J. E. SMADEL et E. B. JACKSON, *Science*, 1947, **106**, 418.
- [11] J. E. SMADEL et E. B. JACKSON, *Proceed. Soc. exp. Biol. a Med.*, 1948, **67**, 478.
- [12] G. BARSKI et J. MAURIN, ces *Annales*, 1950, **78**, 759.
- [13] F. HIMMELWEIT, *Lancet*, 1945, **2**, 104.
- [14] W. F. ELFORD, *J. Gen. Microbiol.*, 1948, **2**, 205.

Les communications suivantes paraissent ou paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Titration de la sensibilité de *Mycobacterium tuberculosis* aux antibiotiques. Enseignements tirés après 2.000 titrages effectués dans un but clinique et de recherches, par P. J. COLETSOS.

Nouvelles recherches sur le tactisme leucocytaire : tactisme et oxydation cellulaire, par M^{me} J. LEBRUN-PAGES et J. ROBINEAUX.

Polyoside capsulaire d'un champignon pathogène, *Torulopsis neoformans*. Relation avec la virulence, par E. DROUHET et G. SEGRETAIN.

Agglutinations croisées. Tularémie-brucellose. Mise au point de la question, par G. GIRARD.

Le contrôle bactériologique des produits biologiques au moyen d'un milieu permettant la culture à l'air libre des germes aérobies et anaérobies, par P. H. BONNEL.

Préparation de lysats bactériophagiques de titre élevé. Purification et concentration par deux adsorptions successives sur phosphate de calcium, par R. WAHL, A. TERRADE et G. MONCEAUX.

Antibiotiques et lyse bactériophagique. — VII. L'action anti-phage de la chloromycétine, par E. EDLINGER et M. FAGUET.

LIVRES REÇUS

Rickettsial Diseases of Man. American Association for the Advancement of Science, 1515 Massachusetts Av. N. W., Washington 5 (1948).

Ce livre est le résultat d'un colloque sur les maladies rickettsiennes de l'homme organisé par la section des sciences médicales de l'Association américaine pour l'Avancement des Sciences.

Il a permis de faire le point en 1948, et de façon remarquable, de nos connaissances sur les maladies rickettsiennes transmissibles à l'homme. On sait, en effet, que le nombre de celles-ci s'est augmenté d'acquisitions récentes telle la rickettsiose vésiculeuse et, d'autre part, que les méthodes d'étude et de traitement ont été profondément influencées par les travaux poursuivis à la faveur de la guerre. C'est ainsi qu'à côté de la classique réaction de Weil-Felix, des réactions sérologiques spécifiques nouvelles comme l'agglutination des rickettsies ou la déviation du complément ont pris place parmi les méthodes pratiques de diagnostic. Enfin, le traitement comme la prophylaxie des affections rickettsiennes ont été renouvelés par l'introduction de méthodes chimiothérapiques de prévention (D.D.T.) et de traitement (chloramphénicol).

Vingt-sept collaborateurs différents, particulièrement désignés par le rôle qu'ils ont joué, soit dans l'étude expérimentale ou théorique des rickettsioses, soit dans la lutte pratique contre ces fléaux, ont pris part à la rédaction de l'ouvrage, où l'on trouvera traités successivement les différents aspects du typhus exanthématique et murin sur les différents théâtres de guerre, le typhus tropical, les rickettsioses nouvelles comme la Q. fever et la rickettsiose vésiculeuse, les vecteurs et réservoirs des différentes rickettsioses, l'épidémiologie et le traitement des typhus, les réactions sérologiques et leurs méthodes d'application, enfin la chimiothérapie prophylactique par les insecticides modernes. Chaque

chapitre se termine par une bibliographie des travaux récents. De nombreux tableaux et schémas illustrent le texte. L'ensemble constitue un document d'une valeur inappréciable, dont la lecture s'impose à tous ceux qu'intéressent à un titre quelconque les rickettsioses humaines.

P. L.

J. Glaister. *Medical Jurisprudence and Toxicology*, E. et S. Livingstone Ltd., 1950, 9^e édition, 755 pages, 22 × 15 cm., prix : 35 S.

La neuvième édition de cet ouvrage extrêmement complet et remarquablement illustré est aussi intéressante que les précédentes. C'est à la fois un traité de médecine légale et un ouvrage de jurisprudence criminelle anglo-saxonne (droit écossais et droit anglais). Le premier point de vue intéressera principalement le lecteur français. Les aspects les plus modernes de la question y sont traités, puisque l'on y trouve même un chapitre sur les lésions anatomo-pathologiques de la bombe atomique. La qualité des illustrations est aussi remarquable du point de vue documentaire qu'impressionnante pour le lecteur.

P. L.

G. Payling Wright. — *An Introduction to Pathology*. Longmans Green and Co, London, 1950, 569 pages, 23 × 16 cm., prix : 30 S.

Cet ouvrage, qui dépasse le niveau élémentaire, sert d'introduction à la fois à la pathologie générale et à l'anatomie pathologique. Ces vieux sujets ont été renouvelés par une présentation originale qui traite successivement les facteurs tels que le milieu, l'hérédité, etc., puis les mécanismes pathologiques, physiques, chimiques, etc., aussi bien que ceux résultant de l'infection ou des altérations physiologiques organiques. Le tout est traité à la lumière des travaux et des conceptions nouvelles (grands syndromes physiopathologiques, rôle des virus, carcinogénèse, etc.). La remarquable qualité d'une abondante illustration ajoute à l'intérêt de l'ouvrage.

P. L.

Sir Lionel Whitby et C. J. C. Britton. — *Disorders of the Blood*. J. et L. Churchill Ltd., London, 1950, 6^e édition, 759 pages, 12 planches en couleurs, 25 × 17 cm., prix : 42 S.

Le succès que connaît dans les pays de langue anglo-saxonne ce traité justifiait une sixième édition. L'examen du sang, les modifications de sa composition et de ses éléments à l'état normal et à l'état pathologique suivant les différentes méthodes et au cours des différentes maladies sont traités d'une façon très approfondie, qui fait de ce volume l'un des traités les plus complets qui soit à l'heure actuelle.

P. L.

H. Thiele. — *Praktikum der Kolloidchemie als Einführung in die Arbeitsmethoden*. 1 vol., 228 p., 121 fig., D. Steinkopf, Frankfurt/Main, édit. 1950. Prix : broché, 16 DM ; relié, 18 DM.

Ce petit livre, qui porte en sous-titre « Introduction aux méthodes de travail », étudie, après quelques considérations générales, la dialyse,

l'ultrafiltration, la floculation, la sensibilisation et la protection (colloïdes protecteurs), puis, d'une façon plus détaillée, les émulsions et les aérosols, que l'auteur estime avoir été un peu négligés jusqu'ici. Viennent ensuite des chapitres consacrés à l'adsorption et à la chromatographie, aux échanges d'ions, aux teintures et corroyage, aux diverses propriétés optiques et électriques des colloïdes, aux questions de tension superficielle, aux propriétés des sols et des gels, etc.

P. L.

F. H. Müller. — *Neue Ergebnisse der Kolloidwissenschaft*. 1 vol., 184 p., 154 fig., D. Steinköpf, Frankfurt/Main, 1949, édit. Prix : cart., 24 DM.

Ce volume, qui constitue le tome 14 des publications de la Kolloid-Gesellschaft, est un compte rendu des communications et des discussions présentées à la 14^e session de la Kolloid-Gesellschaft, tenue à Wiesbaden les 16 et 17 octobre 1949, qu'on trouvera également dans le Kolloid-Zeitschrift, tome 115, dont le présent volume est un tirage à part.

P. L.

Le Gérant : G. MASSON.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

EXTRAIT DES STATUTS :

Article premier. — L'association dite Association des Microbiologistes de Langue Française, fondée en 1937, à Paris, a pour but de grouper les microbiologistes de langue française et de créer entre eux un lien. Elle a son siège à Paris.

L'association se compose de membres nationaux et de membres étrangers de toutes langues.

La langue française est la langue officielle des Congrès de l'Association et celle de la publication de ses travaux.

Art. 2. — L'A. M. L. F. est instituée uniquement pour l'étude et la discussion en commun de toutes les disciplines relevant de la science microbiologique.

Art. 3. — Les membres nationaux de l'A. M. L. F., ainsi que les membres étrangers résidant habituellement en France constituent la Section française de l'A. M. L. F. ou SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE. La Section française de l'A. M. L. F. reçoit dans l'intervalle des Congrès une délégation permanente du Conseil de l'A. M. L. F. Son activité est régie par un règlement intérieur, approuvé par l'Assemblée Générale.

Art. 4. — La Section française de l'A. M. L. F. ou SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE, constitue de plein droit la Section française de l'Association internationale de Microbiologie.

Art. 5. — Peut faire partie de l'Association toute personne remplissant une fonction scientifique dans un laboratoire de microbiologie (microbiologie pure ou appliquée, bactériologie, pathologie infectieuse, immunologie, sérologie, chimiothérapie, cancérologie), ou ayant publié des travaux scientifiques de microbiologie.

Art. 23. — *Publications* — Les publications des travaux exposés dans les séances mensuelles se font dans les conditions et selon les modalités décidées par le Bureau de la Section française.

Le Bureau peut refuser de publier tout travail ou communication, qui ne serait pas conforme aux buts de l'association ou au caractère de ses publications. Ses décisions sont sans recours.

Art. 27. — Les auteurs des communications et démonstrations devront être membres de l'Association. Les étrangers à l'Association ne seront acceptés comme auteurs que s'ils ont pour co-signataire un membre de l'association, ou s'ils ont été invités par le Bureau à faire une communication, ou si un membre de l'Association ayant assisté aux recherches rapportées se charge de discuter le travail en séance.

En dehors des Congrès, dont la périodicité et la date sont fixées par l'Assemblée Générale sur la proposition du Bureau, l'Association se réunit en séances consacrées à des communications scientifiques, le premier jeudi de chaque mois (août et septembre exceptés), à 16 heures. Les séances ont lieu au Grand Amphithéâtre de l'Institut Pasteur ; elles sont publiques.

Les membres désirant présenter des communications sont priés d'en aviser le Secrétaire général, et de lui en communiquer le titre, pour permettre l'établissement de l'ordre du jour de la réunion.

Le texte des communications doit être remis à la séance, établi en *variatur*, en exemplaire dactylographié original. La bibliographie

des auteurs cités sera établie, conformément aux règles admises par l'Association Internationale de Microbiologie, dans l'ordre suivant : nom de l'auteur, titre du périodique (en abrégé et en italique), année de publication, tome (en chiffres arabes gras), page. Les signes t., p., etc., sont supprimés. Les abréviations des noms de périodiques courants figurent sur une liste qui sera adressée aux auteurs, sur leur demande. Les figures illustrant le texte doivent être remises avec leurs clichés typographiques, sinon il pourra en résulter des délais de publication. La Rédaction se charge, le cas échéant, de faire faire tous les dessins, graphiques, tracés, et de faire cliché aux frais des auteurs, tous les documents qui lui seront adressés à temps, soit huit jours au moins avant la séance, pour parution du numéro suivant des *Annales de l'Institut Pasteur*.

En raison des restrictions apportées aux publications par les circonstances actuelles, le texte de chaque communication ne pourra occuper plus de deux pages de l'emplacement réservé dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, soit environ 1.200 mots. Les références bibliographiques et les clichés, s'il y en a, seront compris dans cet espace. Toute communication dépassant ce maximum sera retournée à son auteur, ou devra avoir été préalablement acceptée par la Rédaction des *Annales de l'Institut Pasteur*, pour y paraître sous le titre de Mémoire.

Le Secrétaire général : P. LÉPINE.

RECEIVED

NOV - 7 1950

CHESEBROUGH MANUFACTURING CO. Séance du 6 Juillet 1950 (suite).

CONSOLIDATED

McKEES ROCKS PLANT

SOMMAIRE

Page

Communications (suite) :

Transmission de la tuberculose par les mouches, par F. TISON	4
Essai sur le virus poliomyélique, souche Lansing, de divers composés organiques et de quelques germes anaérobies, par M ^{me} GASTAMBEDE-ODIER	4
Sur quelques formes d'actinomycétales aérobies observées dans les sédiments oligocènes du bassin de Manosque (Basses-Alpes), par HÉLÈNE WINOGRADSKY et J. APPERT	4
Existence d'une capsule glucidique chez <i>Bacillus megatherium</i> , par J.-P. AUBERT et M ^{lle} J. MILLET	4
Fixité de virulence des <i>Salmonella</i> , par J. BRISOU et J. BRANGIER	4
Action du chloramphénicol <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> sur quelques pasteurelles animales, par J.-L. GAUTHIER	4
Antibiotiques et lyse bactériophagique. — VI. Action de la chloromycétine sur la culture d'un staphylocoque et sur la lyse bactériophagique de cette culture, par MICHEL FAGUET et ÉWALD EDLINGER	4
Livres reçus	4